

18/5/8
DIALOG(R)File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

009177505

WPI Acc No: 1992-304940/199237

XRAM Acc No: C92-135798

Synthetic gene for prepn. of human serum albumin - comprises synthetic
DNA contg. gene coding the albumin using coding in Escherichia coli

Patent Assignee: AJINOMOTO KK (AJIN)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 4211375	A	19920803	JP 9114600	A	19910205	199237 B

Priority Applications (No Type Date): JP 9025682 A 19900205

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 4211375	A		37 C12N-015/14	

Abstract (Basic): JP 4211375 A

A synthetic DNA contg. a gene coding human serum albumin (I)
designed by frequently using codons used frequently in E coli, pref.
having a specified restriction enzyme map, is new. A plasmid contg. the
above synthetic DNA, a microbe transformed by the plasmid, and the
prepn. of (I) in which the microbe is cultured in medium and (I) is
isolated from the microbe body or the culture, are claimed.

USE/ADVANTAGE - (I) productivity in E coli is enhanced

Dwg.0/0

Title Terms: SYNTHETIC; GENE; PREPARATION; HUMAN; SERUM; ALBUMIN; COMPRISE;
SYNTHETIC; DNA; CONTAIN; GENE; CODE; ALBUMIN; CODE; ESCHERICHIA; COLI

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12N-015/14

International Patent Class (Additional): C12N-001/21; C12P-021/02;

C12R-001-19; C12R-001-125; C12R-001-08

File Segment: CPI

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平4-211375

(43) 公開日 平成4年(1992)8月3日

(51) Int.Cl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 15/14	Z N A	7236-4B		
1/21				
C 1 2 P 21/02		C 8214-4B		
// (C 1 2 N 1/21		8828-4B	C 1 2 N 15/00	A
			審査請求 未請求 請求項の数9(全 37 頁)	最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平3-14600

(22) 出願日 平成3年(1991)2月5日

(31) 優先権主張番号 特願平2-25682

(32) 優先日 平2(1990)2月5日

(33) 優先権主張国 日本 (J P)

(71) 出願人 000000066

味の素株式会社

東京都中央区京橋1丁目15番1号

(72) 発明者 橋口 賢一

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の

素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 児島 宏之

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の

素株式会社中央研究所内

(72) 発明者 山田 和彦

神奈川県川崎市川崎区鈴木町1番1号味の

素株式会社中央研究所内

(74) 代理人 弁理士 湯浅 恭三 (外4名)

(54) 【発明の名称】 合成遺伝子及びそれを用いたヒト血清アルブミンの製造法

(57) 【要約】

【構成】大腸菌で多用されるコドンを用いて設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNAを構築する。この合成DNAをプラスミドに組み込み、微生物に導入して該微生物を形質転換する。最後に、この形質転換体を培地中で培養し、その菌体内または培地中からヒト血清アルブミンを単離する。

【効果】大腸菌等においてのヒト血清アルブミン生産量を飛躍的に増加させることができる。

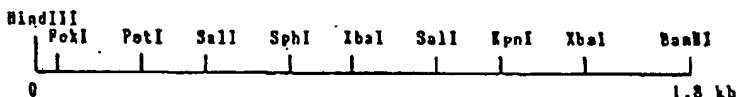
1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 大腸菌で多用されるコドンを用いて設計した、ヒト血清アルブミン蛋白をコードする遺伝子を含む合成DNA。

【請求項2】 合成DNAがヒト血清アルブミン蛋白の*



【請求項4】 合成DNAが配列表の配列番号1で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項5】 合成DNAが配列表の配列番号2で示される配列を有するものである請求項1記載の合成DNA。

【請求項6】 請求項1ないし5記載の合成DNAを含むプラスミド。

【請求項7】 請求項6記載のプラスミドで形質転換された微生物。

【請求項8】 微生物がエシェリシア・コリ (*E. coli*)、バチルス・サチルス (*B. subtilis*) またはバチルス・ブレビス (*B. brevis*) である請求項7記載の微生物。

【請求項9】 請求項7または8記載の微生物を培地中で培養し、その微生物菌体または培地中からヒト血清アルブミンを単離することを特徴とするヒト血清アルブミンの製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明はヒト血清アルブミン (HSA) をコードする遺伝子を含む合成DNA、合成DNAを有するプラスミド、該プラスミドにより形質転換された微生物及び該微生物を培養してヒト血清アルブミンを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】 組換えDNA技術の進歩によって、大腸菌等の微生物において高等真核生物由来の遺伝子を発現させ、その目的遺伝子産物を微生物を培養することによって取得する技術が発展してきた。一般に高等真核生物の遺伝子は、mRNAを調製して、逆転写酵素によって作製したcDNAからクローニングすることによって得られている。ヒト血清アルブミンについても、例えば特開昭58-56684等にcDNAの調製法が開示されている。

【0003】 蛋白質をコードする遺伝子はその蛋白質のアミノ酸配列を1アミノ酸につきDNAの3塩基からなる遺伝暗号 (コドン) によってコードしているが、あるアミノ酸に対応する遺伝暗号は必ずしも1つではない。そして、大量に発現している遺伝子では生物種によって使用されている遺伝暗号に偏りがみられることが知られ

* N末端付近をコードする領域に単一の制限酵素切断部位を保持することを特徴とする請求項1記載の合成DNA。

【請求項3】 合成DNAが下記に示す制限酵素地図を有するものである請求項1記載の合成DNA。

ている。

【0004】 従って、前記の方法で調製されたcDNAからなる遺伝子は高等真核生物において多用される遺伝暗号からなる遺伝子であり、必ずしも大腸菌等の原核生物である微生物における発現に好適なものではない。

【0005】 また、遺伝子を発現させるには適当な発現制御系に接続する必要がある、より好適な発現制御系に接続することによって同じ遺伝子の発現効率を飛躍的に高めることが出来ることが知られている。遺伝子をより好適な発現制御系に接続するためには、遺伝子中に存在する制限酵素部位等が適切に配置されていることが操作しやすく、特にコードする蛋白質のN末端付近の領域に単一の制限酵素部位が存在することが望ましい。しかしながら、cDNAにおいては遺伝子中に存在する制限酵素部位は全くランダムと言ってよく、操作上好適な配置をとっている場合は極めて希である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】 上述の如く、高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物を培養することによって工業的に有利に生産するためには、目的遺伝子をより好適な発現制御系に接続することとともに、遺伝子本体もまた宿主たる原核生物である微生物においてより効率よく発現するDNA配列を持ったものであることが望まれる。また、より好適な発現系に接続するにあたっての便宜上、適当な制限酵素部位が、適切に配置されていることが望まれる。本発明の目的は、cDNAを用いて高等真核生物由来の蛋白質を原核生物である微生物に生産せしめる方法の不完全さを是正し、より効率的な遺伝子発現、蛋白質生産を行なうための技術を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、高等真核生物であるヒト由来の蛋白質であるヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物においてより効率的に生産するために、ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列をコードするDNA配列を、

①アミノ酸配列を変化させない。

②操作上有用と思われる制限酵素部位を残し、不都合な制限酵素部位を除く。

③目的蛋白質のN末端をコードする領域に単一の有用な制限酵素部位を設ける。

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で多用されている遺伝暗号(コドン)を用いる。

について考慮しながら設計し、化学合成したDNAのオリゴマーから実際にヒト血清アルブミンを大腸菌等の原核生物である微生物において著量生産させ得る合成DNAを構築するとともに、この合成DNAを含有するプラスミドで形質転換された微生物を培地中で培養することにより目的のヒト血清アルブミンを生産することができ、本発明を完成するに至った。

【0008】さて、cDNAを用いて大腸菌(*E. coli*)、枯草菌(*B. subtilis*)等の微生物でヒト血清アルブミンを生成する方法は、特開昭58-56684、特開昭58-150517、特開昭61-275229、特開昭62-215393などに開示されている。しかしこれらは遺伝暗号(コドン)の選択の余地の無いcDNAの持つ性格の故に、その発現効率、従って生産量には自ずと限界があるものである。大腸菌等におけるヒト血清アルブミン生産量の飛躍的な増加は、本発明によって初めて可能となった。また、特開昭62-29985には特定のアミノ酸配列から類推されるDNA配列一般が開示されているが、本発明のアミノ酸配列は特開昭62-29985に開示されているアミノ酸配列とは多くの相違点がある。

【0009】本発明者らは原核生物に適したコドンに注目して、ヒト血清アルブミンをコードするDNAをデザインして化学合成した。

【0010】なお、オリゴヌクレオチドの合成にはトリエステル法(Nuc. Acid. Res. 10, 6553(1982))や、ホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859(1981))等の方法がすでに開発されており、いずれの方法を用いてもよい。

【0011】また、近年、合成に必要なヌクレオチドや試薬のキット更には自動合成機器も市販されているので、当然これらを用いてもよい。

【0012】次にこの合成DNAを宿主に導入し、増殖、発現させるために適当なプラスミドに組み込む。

【0013】本発明において用いられるプラスミドは特に限定されないが大腸菌を宿主とする場合は通常よく利用されるpSC101、pBR322、pUC19、pUC18、pHSG298、pHSG299、pHSG398、pHSG399等を用いればよい。

【0014】また枯草菌を宿主とする場合には、pUB110、pC194、pE194等を用いればよい。

【0015】パチルス・プレビスを宿主とする場合は、pHY500、pNU200(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 3589(1989))等を用いればよい。もちろん、繰り返し述べるが、本発明は上記プラスミドベクターに限定されるもの

ではない。

【0016】次に、このようにして得た組み換えDNAで宿主を形質転換するのである。形質転換法として①細胞を塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウムで処理する方法(塩化カルシウム、塩化ルビジウム、または磷酸カルシウム法)、②電気パルスによる方法(エレクトロポレーション法)、③プロトプラストを利用する方法(プロトプラスト法)等の方法があるが、いずれの方法を用いてもよい。またその他の方法を用いてもよい。最後にこの形質転換体を培地中で培養して菌体内に生産もしくは培地中に分泌させ、それを精製するのであるが、このプロセスは通常用いられる以下の方法に従えばよい。

【0017】培地は適当な炭素源、窒素源、無機塩類、使用菌株が特に要求する物質を含んだものを用いればよい。培養時間は使用菌株によって多少異なり特に限定されないが、通常5時間から100時間程度でよい。

【0018】生成物の取り上げ方法は、菌体内に顆粒状に生産させた場合は、集菌後菌体をリゾチーム、超音波等で処理して破砕し、低速遠心によって顆粒を沈澱、採取し、尿素や塩酸グアニジン等で処理して可溶化する。それを希釈や透析等によって巻き戻しを行い、通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。培地に分泌生産した場合は、菌体を除去後、培地から通常よく用いられるHPLC法等によって精製すればよい。

【0019】以下、本発明を実施例に従って具体的に説明する。

【0020】

【実施例1】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

遺伝子の設計

現在の合成DNA技術と、本発明者らの採用している精製法では安定して得られるDNA鎖は最大70塩基程度である。ヒト血清アルブミンは585アミノ酸であるので1755塩基の遺伝子が少なくとも必要であり、少なくとも25本程度に分割して合成する必要がある。また2本鎖としてプラスミドに組み込む必要があるため、その2倍のDNAを合成する必要がある。またプラスミドに組み込んだ時点で塩基配列の確認が必要なので確実に塩基配列が確認できる長さに分けてプラスミドに組み込む方が操作上都合がよい。従って全体を一度に組み立てるのではなく、8つ程度の部分に分けてフラグメントの集合を行い、そこで塩基配列の確認を行ってから全体を構築することにした。

【0021】以上の前提条件をもとに、

- ①ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列を変化させない。
- ②集合させる時に用いる制限酵素の認識部位を必要なだけ持たせる。

【0022】(不必要な認識部位を除く。)

③N末端のなるべく近くに遺伝子内で単一の制限酵素部

5

位を1つ持たせる。(様々な発現システムへ容易に遺伝子を接統することを可能にする。)

④安定な2次構造を取らないようにする。

⑤大腸菌で汎用されている遺伝子暗号をなるべく用いる。

の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある(FEBS LETTERS 58, 134, (1975), Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982), J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0023】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考えられること、報告されている年次が新しいことの2つの理由により、アミノ酸配列そのものを決定した文献ではなく、mRNAより作製したcDNAの塩基配列を決定することによってアミノ酸配列を報告している比較的
10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210 220 230 240 250 260 270 280 290 300 310 320 330 340 350 360 370 380 390 400 410 420 430 440 450 460 470 480 490 500 510 520 530 540 550 560 570 580 590 600 610 620 630 640 650 660 670 680 690 700 710 720 730 740 750 760 770 780 790 800 810 820 830 840 850 860 870 880 890 900 910 920 930 940 950 960 970 980 990 1000 1010 1020 1030 1040 1050 1060 1070 1080 1090 1100 1110 1120 1130 1140 1150 1160 1170 1180 1190 1200 1210 1220 1230 1240 1250 1260 1270 1280 1290 1300 1310 1320 1330 1340 1350 1360 1370 1380 1390 1400 1410 1420 1430 1440 1450 1460 1470 1480 1490 1500 1510 1520 1530 1540 1550 1560 1570 1580 1590 1600 1610 1620 1630 1640 1650 1660 1670 1680 1690 1700 1710 1720 1730 1740 1750 1760 1770 1780 1790 1800 1810 1820 1830 1840 1850 1860 1870 1880 1890 1900 1910 1920 1930 1940 1950 1960 1970 1980 1990 2000 2010 2020 2030 2040 2050 2060 2070 2080 2090 2100 2110 2120 2130 2140 2150 2160 2170 2180 2190 2200 2210 2220 2230 2240 2250 2260 2270 2280 2290 2300 2310 2320 2330 2340 2350 2360 2370 2380 2390 2400 2410 2420 2430 2440 2450 2460 2470 2480 2490 2500 2510 2520 2530 2540 2550 2560 2570 2580 2590 2600 2610 2620 2630 2640 2650 2660 2670 2680 2690 2700 2710 2720 2730 2740 2750 2760 2770 2780 2790 2800 2810 2820 2830 2840 2850 2860 2870 2880 2890 2900 2910 2920 2930 2940 2950 2960 2970 2980 2990 3000 3010 3020 3030 3040 3050 3060 3070 3080 3090 3100 3110 3120 3130 3140 3150 3160 3170 3180 3190 3200 3210 3220 3230 3240 3250 3260 3270 3280 3290 3300 3310 3320 3330 3340 3350 3360 3370 3380 3390 3400 3410 3420 3430 3440 3450 3460 3470 3480 3490 3500 3510 3520 3530 3540 3550 3560 3570 3580 3590 3600 3610 3620 3630 3640 3650 3660 3670 3680 3690 3700 3710 3720 3730 3740 3750 3760 3770 3780 3790 3800 3810 3820 3830 3840 3850 3860 3870 3880 3890 3900 3910 3920 3930 3940 3950 3960 3970 3980 3990 4000 4010 4020 4030 4040 4050 4060 4070 4080 4090 4100 4110 4120 4130 4140 4150 4160 4170 4180 4190 4200 4210 4220 4230 4240 4250 4260 4270 4280 4290 4300 4310 4320 4330 4340 4350 4360 4370 4380 4390 4400 4410 4420 4430 4440 4450 4460 4470 4480 4490 4500 4510 4520 4530 4540 4550 4560 4570 4580 4590 4600 4610 4620 4630 4640 4650 4660 4670 4680 4690 4700 4710 4720 4730 4740 4750 4760 4770 4780 4790 4800 4810 4820 4830 4840 4850 4860 4870 4880 4890 4900 4910 4920 4930 4940 4950 4960 4970 4980 4990 5000 5010 5020 5030 5040 5050 5060 5070 5080 5090 5100 5110 5120 5130 5140 5150 5160 5170 5180 5190 5200 5210 5220 5230 5240 5250 5260 5270 5280 5290 5300 5310 5320 5330 5340 5350 5360 5370 5380 5390 5400 5410 5420 5430 5440 5450 5460 5470 5480 5490 5500 5510 5520 5530 5540 5550 5560 5570 5580 5590 5600 5610 5620 5630 5640 5650 5660 5670 5680 5690 5700 5710 5720 5730 5740 5750 5760 5770 5780 5790 5800 5810 5820 5830 5840 5850 5860 5870 5880 5890 5900 5910 5920 5930 5940 5950 5960 5970 5980 5990 6000 6010 6020 6030 6040 6050 6060 6070 6080 6090 6100 6110 6120 6130 6140 6150 6160 6170 6180 6190 6200 6210 6220 6230 6240 6250 6260 6270 6280 6290 6300 6310 6320 6330 6340 6350 6360 6370 6380 6390 6400 6410 6420 6430 6440 6450 6460 6470 6480 6490 6500 6510 6520 6530 6540 6550 6560 6570 6580 6590 6600 6610 6620 6630 6640 6650 6660 6670 6680 6690 6700 6710 6720 6730 6740 6750 6760 6770 6780 6790 6800 6810 6820 6830 6840 6850 6860 6870 6880 6890 6900 6910 6920 6930 6940 6950 6960 6970 6980 6990 7000 7010 7020 7030 7040 7050 7060 7070 7080 7090 7100 7110 7120 7130 7140 7150 7160 7170 7180 7190 7200 7210 7220 7230 7240 7250 7260 7270 7280 7290 7300 7310 7320 7330 7340 7350 7360 7370 7380 7390 7400 7410 7420 7430 7440 7450 7460 7470 7480 7490 7500 7510 7520 7530 7540 7550 7560 7570 7580 7590 7600 7610 7620 7630 7640 7650 7660 7670 7680 7690 7700 7710 7720 7730 7740 7750 7760 7770 7780 7790 7800 7810 7820 7830 7840 7850 7860 7870 7880 7890 7900 7910 7920 7930 7940 7950 7960 7970 7980 7990 8000 8010 8020 8030 8040 8050 8060 8070 8080 8090 8100 8110 8120 8130 8140 8150 8160 8170 8180 8190 8200 8210 8220 8230 8240 8250 8260 8270 8280 8290 8300 8310 8320 8330 8340 8350 8360 8370 8380 8390 8400 8410 8420 8430 8440 8450 8460 8470 8480 8490 8500 8510 8520 8530 8540 8550 8560 8570 8580 8590 8600 8610 8620 8630 8640 8650 8660 8670 8680 8690 8700 8710 8720 8730 8740 8750 8760 8770 8780 8790 8800 8810 8820 8830 8840 8850 8860 8870 8880 8890 8900 8910 8920 8930 8940 8950 8960 8970 8980 8990 9000 9010 9020 9030 9040 9050 9060 9070 9080 9090 9100 9110 9120 9130 9140 9150 9160 9170 9180 9190 9200 9210 9220 9230 9240 9250 9260 9270 9280 9290 9300 9310 9320 9330 9340 9350 9360 9370 9380 9390 9400 9410 9420 9430 9440 9450 9460 9470 9480 9490 9500 9510 9520 9530 9540 9550 9560 9570 9580 9590 9600 9610 9620 9630 9640 9650 9660 9670 9680 9690 9700 9710 9720 9730 9740 9750 9760 9770 9780 9790 9800 9810 9820 9830 9840 9850 9860 9870 9880 9890 9900 9910 9920 9930 9940 9950 9960 9970 9980 9990 10000 10010 10020 10030 10040 10050 10060 10070 10080 10090 10100 10110 10120 10130 10140 10150 10160 10170 10180 10190 10200 10210 10220 10230 10240 10250 10260 10270 10280 10290 10300 10310 10320 10330 10340 10350 10360 10370 10380 10390 10400 10410 10420 10430 10440 10450 10460 10470 10480 10490 10500 10510 10520 10530 10540 10550 10560 10570 10580 10590 10600 10610 10620 10630 10640 10650 10660 10670 10680 10690 10700 10710 10720 10730 10740 10750 10760 10770 10780 10790 10800 10810 10820 10830 10840 10850 10860 10870 10880 10890 10900 10910 10920 10930 10940 10950 10960 10970 10980 10990 11000 11010 11020 11030 11040 11050 11060 11070 11080 11090 11100 11110 11120 11130 11140 11150 11160 11170 11180 11190 11200 11210 11220 11230 11240 11250 11260 11270 11280 11290 11300 11310 11320 11330 11340 11350 11360 11370 11380 11390 11400 11410 11420 11430 11440 11450 11460 11470 11480 11490 11500 11510 11520 11530 11540 11550 11560 11570 11580 11590 11600 11610 11620 11630 11640 11650 11660 11670 11680 11690 11700 11710 11720 11730 11740 11750 11760 11770 11780 11790 11800 11810 11820 11830 11840 11850 11860 11870 11880 11890 11900 11910 11920 11930 11940 11950 11960 11970 11980 11990 12000 12010 12020 12030 12040 12050 12060 12070 12080 12090 12100 12110 12120 12130 12140 12150 12160 12170 12180 12190 12200 12210 12220 12230 12240 12250 12260 12270 12280 12290 12300 12310 12320 12330 12340 12350 12360 12370 12380 12390 12400 12410 12420 12430 12440 12450 12460 12470 12480 12490 12500 12510 12520 12530 12540 12550 12560 12570 12580 12590 12600 12610 12620 12630 12640 12650 12660 12670 12680 12690 12700 12710 12720 12730 12740 12750 12760 12770 12780 12790 12800 12810 12820 12830 12840 12850 12860 12870 12880 12890 12900 12910 12920 12930 12940 12950 12960 12970 12980 12990 13000 13010 13020 13030 13040 13050 13060 13070 13080 13090 13100 13110 13120 13130 13140 13150 13160 13170 13180 13190 13200 13210 13220 13230 13240 13250 13260 13270 13280 13290 13300 13310 13320 13330 13340 13350 13360 13370 13380 13390 13400 13410 13420 13430 13440 13450 13460 13470 13480 13490 13500 13510 13520 13530 13540 13550 13560 13570 13580 13590 13600 13610 13620 13630 13640 13650 13660 13670 13680 13690 13700 13710 13720 13730 13740 13750 13760 13770 13780 13790 13800 13810 13820 13830 13840 13850 13860 13870 13880 13890 13900 13910 13920 13930 13940 13950 13960 13970 13980 13990 14000 14010 14020 14030 14040 14050 14060 14070 14080 14090 14100 14110 14120 14130 14140 14150 14160 14170 14180 14190 14200 14210 14220 14230 14240 14250 14260 14270 14280 14290 14300 14310 14320 14330 14340 14350 14360 14370 14380 14390 14400 14410 14420 14430 14440 14450 14460 14470 14480 14490 14500 14510 14520 14530 14540 14550 14560 14570 14580 14590 14600 14610 14620 14630 14640 14650 14660 14670 14680 14690 14700 14710 14720 14730 14740 14750 14760 14770 14780 14790 14800 14810 14820 14830 14840 14850 14860 14870 14880 14890 14900 14910 14920 14930 14940 14950 14960 14970 14980 14990 15000 15010 15020 15030 15040 15050 15060 15070 15080 15090 15100 15110 15120 15130 15140 15150 15160 15170 15180 15190 15200 15210 15220 15230 15240 15250 15260 15270 15280 15290 15300 15310 15320 15330 15340 15350 15360 15370 15380 15390 15400 15410 15420 15430 15440 15450 15460 15470 15480 15490 15500 15510 15520 15530 15540 15550 15560 15570 15580 15590 15600 15610 15620 15630 15640 15650 15660 15670 15680 15690 15700 15710 15720 15730 15740 15750 15760 15770 15780 15790 15800 15810 15820 15830 15840 15850 15860 15870 15880 15890 15900 15910 15920 15930 15940 15950 15960 15970 15980 15990 16000 16010 16020 16030 16040 16050 16060 16070 16080 16090 16100 16110 16120 16130 16140 16150 16160 16170 16180 16190 16200 16210 16220 16230 16240 16250 16260 16270 16280 16290 16300 16310 16320 16330 16340 16350 16360 16370 16380 16390 16400 16410 16420 16430 16440 16450 16460 16470 16480 16490 16500 16510 16520 16530 16540 16550 16560 16570 16580 16590 16600 16610 16620 16630 16640 16650 16660 16670 16680 16690 16700 16710 16720 16730 16740 16750 16760 16770 16780 16790 16800 16810 16820 16830 16840 16850 16860 16870 16880 16890 16900 16910 16920 16930 16940 16950 16960 16970 16980 16990 17000 17010 17020 17030 17040 17050 17060 17070 17080 17090 17100 17110 17120 17130 17140 17150 17160 17170 17180 17190 17200 17210 17220 17230 17240 17250 17260 17270 17280 17290 17300 17310 17320 17330 17340 17350 17360 17370 17380 17390 17400 17410 17420 17430 17440 17450 17460 17470 17480 17490 17500 17510 17520 17530 17540 17550 17560 17570 17580 17590 17600 17610 17620 17630 17640 17650 17660 17670 17680 17690 17700 17710 17720 17730 17740 17750 17760 17770 17780 17790 17800 17810 17820 17830 17840 17850 17860 17870 17880 17890 17900 17910 17920 17930 17940 17950 17960 17970 17980 17990 18000 18010 18020 18030 18040 18050 18060 18070 18080 18090 18100 18110 18120 18130 18140 18150 18160 18170 18180 18190 18200 18210 18220 18230 18240 18250 18260 18270 18280 18290 18300 18310 18320 18330 18340 18350 18360 18370 18380 18390 18400 18410 18420 18430 18440 18450 18460 18470 18480 18490 18500 18510 18520 18530 18540 18550 18560 18570 18580 18590 18600 18610 18620 18630 18640 18650 18660 18670 18680 18690 18700 18710 18720 18730 18740 18750 18760 18770 18780 18790 18800 18810 18820 18830 18840 18850 18860 18870 18880 18890 18900 18910 18920 18930 18940 18950 18960 18970 18980 18990 19000 19010 19020 19030 19040 19050 19060 19070 19080 19090 19100 19110 19120 19130 19140 19150 19160 19170 19180 19190 19200 19210 19220 19230 19240 19250 19260 19270 19280 19290 19300 19310 19320 19330 19340 19350 19360 19370 19380 19390 19400 19410 19420 19430 19440 19450 19460 19470 19480 19490 19500 19510 19520 19530 19540 19550 19560 19570 19580 19590 19600 19610 19620 19630 19640 19650 19660 19670 19680 19690 19700 19710 19720 19730 19740 19750 19760 19770 19780 19790 19800 19810 19820 19830 19840 19850 19860 19870 19880 19890 19900 19910 19920 19930 19940 19950 19960 19970 19980 19990 20000 20010 20020 20030 20040 20050 20060 20070 20080 20090 20100 20110 20120 20130 20140 20150 20160 20170 20180 20190 20200 20210 20220 20230 20240 20250 20260 20270 20280 20290 20300 20310 20320 20330 20340 20350 20360 20370 20380 20390 20400 20410 20420 20430 20440 20450 20460 20470 20480 20490 20500 20510 20520 20530 20540 20550 20560 20570 20580 20590 20600 20610 20620 20630 20640 20650 20660 20670 20680 20690 20700 20710 20720 20730 20740 20750 20760 20770 20780 20790 20800 20810 20820 20830 20840 20850 20860 20870 20880 20890 20900 20910 20920 20930 20940 20950 20960 20970 20980 20990 21000 21010 21020 21030 21040 21050 21060 21070 21080 21090 21100 21110 21120 21130 21140 21150 21160 21170 21180 21190 21200 21210 21220 21230 21240 21250 21260 21270 21280 21290 21300 21310 21320 21330 21340 21350 21360 21370 21380 21390 21400 21410 21420 21430 21440 21450 21460 21470 21480 21490 21500 21510 21520 21530 21540 215

TTT-Phe 1(0.17%)	<u>TCT-Ser15(2.56%)</u>
TAT-Tyr 0(0.00%)	<u>TGT-Cys 0(0.00%)</u>
<u>TTC-Phe30(5.13%)</u>	<u>TCC-Ser 8(1.37%)</u>
<u>TAC-Tyr18(3.08%)</u>	<u>TGC-Cys35(5.88%)</u>
TTA-Leu 0(0.00%)	TCA-Ser 1(0.17%)
TAA-*** 0(0.00%)	TGA-*** 0(0.00%)
TTG-Leu 0(0.00%)	TGG-Ser 0(0.00%)
TAG-*** 0(0.00%)	<u>TGG-Trp 1(0.17%)</u>
CTT-Leu 3(0.51%)	CCT-Pro 0(0.00%)
CAT-His 0(0.00%)	<u>CCT-Arg13(2.22%)</u>
CTC-Leu 1(0.17%)	CCC-Pro 0(0.00%)
<u>CAC-His16(2.74%)</u>	<u>CGC-Arg10(1.71%)</u>
CTA-Leu 3(0.51%)	GCA-Pro 1(0.17%)
CAA-Gln 1(0.17%)	GGA-Arg 1(0.17%)
<u>CTG-Leu54(9.23%)</u>	<u>CGG-Pro23(3.93%)</u>
<u>CAG-Gln19(3.25%)</u>	CGG-Arg 0(0.00%)
ATT-Ile 0(0.00%)	<u>AGT-Thr 7(1.20%)</u>
AAT-Asn 0(0.00%)	AGT-Ser 0(0.00%)
<u>ATC-Ile 8(1.37%)</u>	<u>ACC-Thr21(3.59%)</u>
<u>AAC-Asn17(2.91%)</u>	ACC-Ser 0(0.00%)
ATA-Ile 0(0.00%)	ACA-Thr 0(0.00%)
<u>AAA-Leu58(9.91%)</u>	ACA-Arg 0(0.00%)
<u>ATG-His 8(1.37%)</u>	ACG-Thr 0(0.00%)
AAG-Lys 2(0.34%)	AGG-Arg 0(0.00%)
<u>CTT-Val17(2.91%)</u>	<u>GCT-Ala22(3.76%)</u>
GAT-Asp 1(0.17%)	<u>GGT-Gly 9(1.54%)</u>
GTC-Val 1(0.17%)	GGC-Ala 0(0.00%)
<u>GAG-Asp35(5.98%)</u>	<u>GGC-Gly 3(0.51%)</u>
<u>GTA-Val13(2.22%)</u>	<u>GGA-Ala22(3.76%)</u>
<u>GAA-Gly57(9.74%)</u>	GGA-Gly 0(0.00%)
<u>GTG-Val10(1.71%)</u>	<u>GCG-Ala18(3.08%)</u>
GAG-Gln 4(0.68%)	GCG-Gly 0(0.00%)

【0029】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン（メジャーコドン）と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユースエージに片寄りが見られないシステインのコードである（参考文献：細胞工学，2，1541（1983））。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ

た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下のようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0030】

【表2】

TTT-Phe21(3.58%)	TCG-Ser 3(0.51%)
TAT-Tyr12(2.05%)	TCG-Gly15(2.56%)
TTC-Phe10(1.71%)	TCG-Ser 5(0.85%)
TAG-Tyr 6(1.02%)	TCG-Cys20(3.41%)
TTA-Leu10(1.71%)	TCG-Ser 6(1.02%)
TAA-*** 1(0.17%)	TGA-*** 0(0.00%)
TTG-Leu12(2.05%)	TCG-Ser 2(0.34%)
TAG-*** 0(0.00%)	TGG-Tyr 1(0.17%)
CTT-Leu18(3.07%)	CGT-Pro10(1.71%)
CAT-His11(1.88%)	CGT-Arg 2(0.34%)
CTC-Leu 5(0.85%)	CCC-Pro 6(1.02%)
CAC-His 5(0.85%)	CGG-Arg 1(0.17%)
CTA-Leu 4(0.68%)	CGA-Pro 7(1.19%)
CAA-Glu10(1.71%)	CGA-Arg 2(0.34%)
CTG-Leu12(2.05%)	CGG-Pro 1(0.17%)
CAG-Glu10(1.71%)	CGG-Arg 2(0.34%)
ATT-Ile 3(0.51%)	ACT-Thr 7(1.19%)
AAT-Asn10(1.71%)	ACT-Ser 6(1.02%)
ATC-Ile 4(0.68%)	ACC-Thr 7(1.19%)
AAC-Asn 7(1.19%)	AGC-Ser 2(0.34%)
ATA-Ile 1(0.17%)	ACA-Thr12(2.05%)
AAA-Lys41(7.00%)	AGA-Arg13(2.22%)
ATG-His 6(1.02%)	ACE-Thr 2(0.34%)
AAG-Lys19(3.24%)	AGG-Arg 4(0.68%)
GTT-Val11(1.88%)	GCT-Ala29(4.95%)
GAT-Asp25(4.27%)	GCT-Gly 2(0.34%)
GTC-Val 7(1.19%)	GCG-Ala14(2.39%)
GAC-Asp11(1.88%)	GCG-Gly 3(0.51%)
GTA-Val 7(1.19%)	GCA-Ala17(2.90%)
GAA-Glu37(6.31%)	GGA-Gly 6(1.02%)
GTG-Val16(2.73%)	GCG-Ala 2(0.34%)
GAG-Glu24(4.10%)	GCG-Gly 1(0.17%)

【0031】さて、図1に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0032】FokIは認識部位の9塩基/13塩基(上側鎖/下側鎖)3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0033】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, XbaI, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断点地図を図3に示した。

【0034】DNAの化学合成

設計したDNA配列(図1)を図4のようにフラグメン

トに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))によりそれぞれ合成した。

【0035】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図3、4に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニールし、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法(Science, 214, 1205 (1981))によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1μgとpUC18またはpUC19約1μgを用いてライゲーションを行い、ブロック1、2、3とプロ

ック4、5と、ブロック6、7、8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローニングした。最後に3つの中間的ブロック約1 μ gとpUC19約1 μ gを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAを構築した(図3)。

[0036]

[実施例2]

[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現]

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNA 10 Aを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSA及びプラスミドpT13s(Nco)(J. Biochem., 104, 30 (1988))とから図6に示すように発現プラスミドpSDHSA4を作成した。なお、プラスミドpT13s(Nco)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447(FERM P-10757)から調製した。

[0037] この発現プラスミドpSDHSA4の調製の 20 詳細は以下の通りである。即ち、pHSAをFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片(合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片)を調製する。一方、pT13s(Nco)をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片(trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片)を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSA4を構築した。

[0038] このようにして得られたプラスミドpSD 30 HSA4は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

[0039] 次にこの発現プラスミドpSDHSA4で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSA4を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH₂PO₄、NH₄Cl、MgSO₄、CaCl₂、ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でイ 40 ンドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成していた。

[0040] 集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

[0041] 図7(A)はHB101、HB101/p 50

SDHSA4の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1、2、3、Mの略号は以下の通りである。

[0042] 1. HB101全菌体蛋白

2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白

3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分

M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSA4の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

[0043] 図7(A)と同様の電気泳動後(蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンブロッティングを行なうと図7(B)のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

[0044] 顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて(final 0.1M)100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

[0045] 以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

[0046] 形質転換株HB101/pSDHSA4(AJ12498)は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている(FERM P-11208)。

[0047] 顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O.Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O.Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

[0048]

[実施例3]

[ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産]

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用されるpUB110(J. Bacteriol., 134, 318 (1978))と大腸菌のベクターpBR327(Gene 9, 287 (1980))とをEcoRI部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクターpBU4371を構築した。pBU4371は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する(図9)。

13

【0049】枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子amyEのうち、 α -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約0.4kbの領域に存在しており、大腸菌 β -lactamaseを枯草菌で分泌するプラスミドpTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986))では、この領域が0.4kb HindIII断片として得られる。

【0050】図10は、 α -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点 (Ala33) 付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子のN末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点とN末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成DNAで連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられるDNA配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII部位の直後、Ala30をコードする配列をGCTからGCCに置換することによって唯一のNotI部位が導入できることが判った。

【0051】そこで、図11のような合成DNAをApplied Biosystems社製のDNA合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクターpASEC1を構築した。pASEC1は、これをNotIとSmaIで切断し、任意の目的遺伝子の3'末端を平滑化してN末端付近の適当な制限酵素Eで切断しておき、両者を5'末端がNotI cohesiveで3'末端が制限酵素Eに合うような合成DNAで連結することによって、amyEのシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるになっている。

【0052】HSA分泌プラスミドの構築

まず図13に示すような2本の合成DNAを作製した。この2つの合成DNAと実施例1で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミドpHSA (図3参照) 及びプラスミドpUC19とから、プラスミドpUC33HSAを構築した (図13)。

【0053】このプラスミドpUC33HSAの構築の詳細を以下に示す。

【0054】即ち、pHSAをFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む1.8kb断片) を調製する。一方、pUC19をBamHIとHindIIIで切断しておく。これらと図13中に示した2本の合成DNAとをT4リガーゼで連結し、目的のプラスミドpUC33HSAを構築した。

【0055】さて次にプラスミドpUC33HSAを制限酵素BamHIで処理した後にクレノウ処理し、次いでNotIで処理することによって得られた1.8kb

14

の断片と、プラスミドpASEC1をNotI, SmaIで処理して得た7.5kbの断片とをT4リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミドpAMY33HSA4である (図14)。

【0056】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌

当業者ならば容易に入手し得る枯草菌1A510株 (J. Bacteriol. 165, 934 (1983)) を上述のプラスミドpAMY33HSA4でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株1A510/pAMY33HSA4を得た。

【0057】このようにして得た形質転換株1A510/pAMY33HSA4とコントロールとしてプラスミドpBU4371を有する形質転換株1A510/pBU4371との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で37℃で振盪培養した。14, 16, 18時間で培養液をサンプリングし、培養上清を1 μ lずつ1回及び5回ナイロンメンブランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノプロットングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中においてStandardは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【0058】形質転換株1A510/pAMY33HSA4 (AJ12493) と1A510/pBU4371 (AJ12492) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSA4がFERMP-11207で、1A510/pBU4371がFERMP-11206である。

【0059】

【実施例4】

【全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の構築】

遺伝子の設計

実施例1と同様の順番に条件を考慮しながら遺伝子の設計を行った。ヒト血清アルブミンのアミノ酸配列は複数の文献によって開示されているが、それらは互いに少しずつの相違がある (FEBS LETTERS 58, 134, (1975), Nucleic Acids Research 9, 6103, (1981), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 71, (1982), J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986))。

【0060】本発明者らは、一般にDNAの配列を求める方がアミノ酸の配列を求めるよりも信頼性が高いと考

えられること、mRNAから逆転写によって作成されるcDNAでは、逆転写の際に塩基の間違いが生じ易いこと、報告された年次が新しいことの3つの理由により、ヒト染色体上のアルブミン遺伝子のDNA塩基配列とアミノ酸配列を決定した文献に報告されているアミノ酸配列が最も信頼性が高いと判断し、J. Biol. Chem. 261, 6747, (1986)に報告されたアミノ酸配列を採用した。

【0061】コンピュータを用いてアミノ酸配列から取り得る制限酵素部位を検索し、それをもとにして大腸菌*10

TTT-Phe 1 (.17%)	TCG-Ser 15 (2.55%)	TAT-Tyr 0 (.00%)	TGT-Cys 0 (.00%)
TTC-Phe 2 (5.10%)	TCG-Ser 16 (1.38%)	TAC-Tyr 18 (3.08%)	TGC-Cys 35 (5.95%)
TTA-Leu 0 (.00%)	TCG-Ser 17 (.17%)	TAA-*** 0 (.00%)	TGA-*** 0 (.00%)
TTG-Leu 0 (.00%)	TCG-Ser 0 (.00%)	TAG-*** 0 (.00%)	TGG-Trp 1 (.17%)
CTT-Leu 3 (.51%)	CCT-Pro 0 (.00%)	CAT-His 0 (.00%)	CGT-Arg 13 (2.21%)
CTC-Leu 1 (.17%)	CCC-Pro 0 (.00%)	CAC-His 18 (2.72%)	CGC-Arg 0 (1.70%)
CTA-Leu 3 (.51%)	CCA-Pro 1 (.17%)	CAA-Gln 11 (1.78%)	CGA-Arg 11 (1.78%)
CTG-Leu 54 (8.18%)	CCG-Pro 23 (3.91%)	CAG-Gln 18 (3.23%)	CGG-Arg 0 (.00%)
ATT-Ile 0 (.00%)	ACT-Thr 7 (1.18%)	AAT-Asn 0 (.00%)	AGT-Ser 0 (.00%)
ATC-Ile 8 (1.38%)	ACC-Thr 21 (3.57%)	AAC-Asn 17 (2.88%)	AGC-Ser 0 (.00%)
ATA-Ile 0 (.00%)	ACA-Thr 0 (.00%)	AAA-Lys 57 (8.88%)	AGA-Arg 0 (.00%)
ATG-Met 5 (1.02%)	ACG-Thr 0 (.00%)	AAG-Lys 2 (.34%)	AGU-Arg 0 (.00%)
GTG-Val 17 (2.88%)	GCT-Ala 22 (3.74%)	GAT-Asp 1 (.17%)	GGT-Gly 8 (1.53%)
GTC-Val 1 (.17%)	GCC-Ala 0 (.00%)	GAC-Asp 35 (5.95%)	GGC-Gly 3 (.51%)
GTA-Val 13 (2.21%)	GCA-Ala 22 (3.74%)	GAA-Glu 58 (9.88%)	GGA-Gly 0 (.00%)
GTC-Val 10 (1.70%)	GCG-Ala 8 (1.38%)	GAG-Glu 4 (.68%)	GGG-Gly 0 (.00%)

【0065】下線を施した部分は、大腸菌で大量に発現するとされている遺伝子に広く用いられているコドン(メジャーコドン)と、一種類しかない、メチオニン、トリプトファン、それにコドンユースエージに片寄りが見られないシステインのコードである(参考文献:細胞工学, 2, 1541 (1983))。上記のようにほとんどメジャーコドンを用いて遺伝子を設計することができ

TTT-Phe 21 (3.58%)	TCG-Ser 3 (.51%)	TAT-Tyr 12 (2.05%)	TGT-Cys 15 (2.58%)
TTC-Phe 10 (1.71%)	TCG-Ser 5 (.86%)	TAC-Tyr 8 (1.02%)	TGC-Cys 20 (3.41%)
TTA-Leu 10 (1.71%)	TCG-Ser 8 (1.02%)	TAA-*** 1 (.17%)	TGA-*** 0 (.00%)
TTG-Leu 12 (2.05%)	TCG-Ser 2 (.34%)	TAG-*** 0 (.00%)	TGG-Trp 1 (.17%)
CTT-Leu 17 (2.90%)	CCT-Pro 10 (1.71%)	CAT-His 11 (1.88%)	CGT-Arg 2 (.34%)
CTC-Leu 6 (1.02%)	CCC-Pro 8 (1.02%)	CAC-His 5 (.85%)	CGC-Arg 1 (.17%)
CTA-Leu 4 (.88%)	CCA-Pro 7 (1.10%)	CAA-Gln 11 (1.88%)	CGA-Arg 2 (.34%)
CTG-Leu 2 (2.05%)	CCG-Pro 1 (.17%)	CAG-Gln 8 (1.54%)	CGG-Arg 2 (.34%)
ATT-Ile 3 (.51%)	ACT-Thr 7 (1.18%)	AAT-Asn 11 (1.88%)	AGT-Ser 6 (1.02%)
ATC-Ile 4 (.88%)	ACC-Thr 8 (1.37%)	AAC-Asn 8 (1.02%)	AGC-Ser 2 (.34%)
ATA-Ile 1 (.17%)	ACA-Thr 11 (1.88%)	AAA-Lys 40 (6.83%)	AGA-Arg 13 (2.27%)
ATG-Met 5 (1.02%)	ACG-Thr 2 (.34%)	AAG-Lys 19 (3.24%)	AGU-Arg 4 (.68%)
GTG-Val 12 (2.05%)	GCT-Ala 20 (4.85%)	GAT-Asp 25 (4.27%)	GGT-Gly 2 (.34%)
GTC-Val 7 (1.18%)	GCC-Ala 14 (2.39%)	GAC-Asp 11 (1.88%)	GGC-Gly 3 (.51%)
GTA-Val 7 (1.18%)	GCA-Ala 17 (2.90%)	GAA-Glu 38 (6.48%)	GGA-Gly 6 (1.02%)
GTC-Val 15 (2.58%)	GCG-Ala 2 (.34%)	GAG-Glu 24 (4.10%)	GGG-Gly 1 (.17%)

【0067】さて、図16に示した配列において、最初にあるAAGCTTのHindIII部位は遺伝子構築の便宜上、付加したものである。またN末端近くにユニークな制限酵素部位を導入する目的で、認識部位と切断部位とが離れているFokIを図2のように導入して切り離すようにした。

【0068】FokIは認識部位の9塩基/13塩基(上側鎖/下側鎖)3'側を切断するので、認識部位を図2のようにアミノ酸配列の5'側に隣接して置くことにより血清アルブミン遺伝子のN末端近くで切断できるようになる。ただしこのためには、遺伝子中のFokI認識配列を全て除いておく必要がある。

【0069】遺伝子全体の構築に用いる制限酵素はHindIII, KpnI, SalI, PstI, Xba

*で汎用されているコドンを選びながら制限酵素部位の取捨選択を行い、DNA配列の最初の候補を作成した。

【0062】その候補配列をコンピュータの高次構造検索プログラムに入力し、著しい二次構造を検索し、取り除いた。最終的に決定した遺伝子の塩基配列を図16に示した。

【0063】この設計した遺伝子でのコドンの使用割合を以下に示した。

【0064】

【表3】

20※た。アミノ酸配列のもとにした文献のヒト血清アルブミンをコードするエクソン部分のDNA配列について同じことを行なうと以下ようになり、大腸菌におけるメジャーコドンの使用頻度はむしろ低いことが判明した。

【0066】

【表4】

1, SphI, BamHIとした。これらの酵素での切断点地図を図17に示した。

【0070】DNAの化学合成

40 設計したDNA配列(図16)を図18のようにフラグメントに分割し、Applied Biosystems社のDNA合成機を用いて各々のフラグメントの両鎖をホスホアミダイト法(Tetrahedron Letters 22, 1859 (1981))によりそれぞれ合成した。

【0071】遺伝子の構築

合成したDNAの260nmの吸光度を測定して濃度を決定した後に、1回の操作で約100ピコモルを用いた。図17, 18に示した制限酵素で8つのブロックにわけ、各ブロックを構成する各断片の両鎖をアニール

し、T4リガーゼでライゲーションして各ブロックに相当する断片を生成させ、それらをpUC18もしくはpUC19にクローン化した。クローン化した各ブロックのDNA配列をジデオキシ法 (Science, 214, 1205 (1981)) によって少なくとも2回にわたって確認した後、各ブロックの断片を調製した。次に各断片約1 μ gとpUC18またはpUC19約1 μ gを用いてライゲーションを行い、ブロック1, 2, 3とブロック4, 5と、ブロック6, 7, 8とをそれぞれ連結した中間的ブロックをpUC18またはpUC19にクローン化した。最後に3つの中間的ブロック約1 μ gとpUC19約1 μ gを用いてライゲーションを行い、全ブロックを連結した目的の遺伝子を含むプラスミドpHSAE2を構築した (図17)。

【0072】

【実施例5】[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大腸菌での発現 (1)]

前出の方法と合成機を用いて図5に示すような合成DNAを作成した。なお、同図中、SDはリボソーム結合部位を表す。次にこの合成DNAと先ほど作成したプラスミドpHSAE2及びプラスミドpT13s (Nco) (J. Biochem., 104, 30 (1988)) とから図19に示すように発現プラスミドpSDHSAE12を作成した。なお、プラスミドpT13s (Nco) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている保持菌株AJ12447 (FERMP-10757) から調製した。

【0073】この発現プラスミドpSDHSAE12の調製の詳細は以下の通りである。即ち、pHSAE2をFokIとBamHIで切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む約1.8kb断片) を調製する。一方、pT13s (Nco) をClaIとBamHIで切断し、大きい方の断片 (trpプロモーター、ターミネーター、アンピシリン耐性遺伝子を含む約2.6kb断片) を調製する。この両者と図5に示した合成DNAとをT4リガーゼでライゲーションしてpSDHSAE12を構築した。

【0074】このようにして得られたプラスミドpSDHSAE12は、trpプロモーター-オペレーターの制御下、Met残基に成熟型HSAが直接連結した蛋白を発現するように設計されており、転写ターミネーターとしてtrpAターミネーターを備えている。

【0075】次にこの発現プラスミドpSDHSAE12で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pSDHSAE12を得た。この株をグルコース、酵母エキス、KH₂PO₄, NH₄Cl, MgSO₄, CaCl₂, ビタミンB1を含む培地で培養した。培養開始後4時間でインドールアクリル酸による誘導をかけ、誘導後約15時間培養したところ、菌体内に顆粒が生成してい

た。

【0076】集菌後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーに懸濁し、0.25mg/mlリゾチームで0℃1時間処理後、超音波破碎した。顆粒を低速遠沈後、20mM Tris-HCl 30mM NaCl 0.5M EDTAバッファーにて洗浄、再び遠沈し、10mM EDTA溶液に懸濁し、顆粒画分とした。

【0077】図7 (A) はHB101, HB101/pSDHSAE12の全菌体蛋白及び顆粒画分をSDSポリアクリルアミド電気泳動した図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

【0078】

1. HB101全菌体蛋白
2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分
- M. 分子量マーカー

HB101/pSDHSAE12の菌体蛋白には、宿主のHB101には見られない分子量約67Kのバンドが認められ、それは、顆粒画分に回収されている。ヒト血清アルブミンの分子量は約67Kであり、予定された分子量の蛋白が顆粒として生成していることがわかった。

【0079】図7 (A) と同様の電気泳動後 (蛋白量は1/30)、抗HSA抗体でウェスタンブロッティングを行なうと図7 (B) のようなパターンになり、顆粒状生成した蛋白は抗ヒト血清アルブミン抗体と反応することが示された。

【0080】顆粒を6M塩酸グアニジンで可溶化し、ジチオスレイトールを加えて (final 0.1M) 100℃2分処理後、逆相HPLCで顆粒蛋白を精製した。これをアミノ酸シーケンサーにかけ、N末端付近のアミノ酸配列を調べたところ、図8のように、調べた16アミノ酸残基の全てが一致した。なお、同図中、Observedは実際に観察された配列を、Predictedは予定した配列をそれぞれ示す。

【0081】以上のことから、大腸菌においてN末端にMet残基の付加した形でヒト血清アルブミンを顆粒状に生成することができたことが示唆された。

【0082】形質転換株HB101/pSDHSAE12 (AJ12576) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている (FERM P-11804)。

【0083】顆粒を6Mグアニジンで可溶化後、1Mジチオスレイトールを1/10量加えて100℃2分で還元を行い、逆相HPLCによって定量したところ本培養によるヒト血清アルブミンの生成量は15~20mg/L/O. Dであった。特開昭61-275229には、大腸菌における最高生成量5~10mg/L/O. Dが記載されている。本発明による生成量は、この最高生成量を2倍以上上回るものである。

【0084】

【実施例6】

【ヒト血清アルブミンの枯草菌における分泌生産】

本発明者らは、まず枯草菌のベクターとして多用される pUB110 (J. Bacteriol. 134, 318 (1978)) と大腸菌のベクター pBR327 (Gene 9, 287 (1980)) とを EcoRI 部位で連結し、大腸菌と枯草菌の両方で複製可能なシャトルベクター pBU4371 を構築した。pBU4371 は、大腸菌ではアンピシリン耐性、枯草菌ではカナマイシン耐性を賦与する (図9)。

【0085】枯草菌の α -アミラーゼ遺伝子 amyE のうち、 α -アミラーゼの発現と分泌に必要な部分は、約 0.4 kb の領域に存在しており、大腸菌 β -lactamase を枯草菌で分泌するプラスミド pTUB256 (Biochem. Biophys. Res. Commun. 134, 624, (1986)) では、この領域が 0.4 kb HindIII 断片として得られる。

【0086】図10は、 α -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離されるシグナルペプチドの切断点 (A1a33) 付近のアミノ酸配列及び DNA 配列を示している。任意のタンパク質の遺伝子を介在配列なしにシグナルペプチド切断点の直後に連結するためには、切断点の直前と目的遺伝子の N 末端の直後に、アミノ酸配列を変えることなくユニークな制限酵素部位を配置し、その間を切断点と N 末端を丁度つなげるようなアミノ酸配列をコードする合成 DNA で連結するとよい。切断点付近のアミノ酸配列から考えられる DNA 配列をもとに可能な制限酵素部位を検索したところ、HapII 部位の直後、A1a30 をコードする配列を GCT から GCC に置換することによって唯一の NotI 部位が導入できることが判った。

【0087】そこで、図11のような合成 DNA を Applied Biosystems 社製の DNA 合成機を用いて作製し、次に図12のようにして汎用分泌ベクター pASEC1 を構築した。pASEC1 は、これを NotI と SmaI で切断し、任意の目的遺伝子の 3' 末端を平滑化して N 末端付近の適当な制限酵素 E で切断しておき、両者を 5' 末端が NotI cohesive で 3' 末端が制限酵素 E に合うような合成 DNA で連結することによって、amyE のシグナルペプチド切断点と任意の目的蛋白とが直接連結した遺伝子を構築することができるようになっている。

【0088】HSA 分泌プラスミドの構築

まず図20に示すような2本の合成 DNA を作製した。この2つの合成 DNA と実施例4で構築した全合成ヒト血清アルブミン遺伝子を含むプラスミド pHSAE2 (図17参照) 及びプラスミド pUC19 とから、プラスミド pUC33HSAE を構築した (図20)。

【0089】このプラスミド pUC33HSAE の構築の詳細を以下に示す。

【0090】即ち、pHSAE2 を FokI と BamHI で切断し、最も大きな断片 (合成ヒト血清アルブミン遺伝子の大部分を含む 1.8 kb 断片) を調製する。一方、pUC19 を BamHI と HindIII で切断しておく。これらと図20中に示した2本の合成 DNA とを T4 リガーゼで連結し、目的のプラスミド pUC33HSAE を構築した。

【0091】さて次にプラスミド pUC33HSAE を制限酵素 BamHI で処理した後にクレノウ処理し、次いで NotI で処理することによって得られた 1.8 kb の断片と、プラスミド pASEC1 を NotI, SmaI で処理して得た 7.5 kb の断片とを T4 リガーゼを用いて結合させた。このようにして得られたプラスミドがヒト血清アルブミン分泌プラスミド pAMY33HSAE2 である (図21)。

【0092】枯草菌によるヒト血清アルブミンの分泌

当業者ならば容易に入手し得る枯草菌 1A510 株 (J. Bacteriol. 165, 934 (1983)) を上述のプラスミド pAMY33HSAE2 でプロトプラスト法により形質転換し、形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 を得た。

【0093】このようにして得た形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 とコントロールとしてプラスミド pBU4371 を有する形質転換株 1A510/pBU4371 との両方をトリプトン、酵母エキス、NaCl、カゼインを含む培地で 37℃ で振盪培養した。14, 16, 18 時間で培養液をサンプリングし、培養上清を 1 μ l ずつ 1 回及び 5 回ナイロンメンブランにスポットして抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてドットイムノプロットングを行なったところ、図15に示すように、ヒト血清アルブミンが培地に分泌生成していたことが確認された。なお、同図中において Standard は、SIGMA の Essential globulin free HUMAN Albumin を用いた。Broth の位置には、培地をスポットした。図中の 1, 2, 4, 5 の位置には 1A510/pAMY33HSAE2 を、3, 6 の位置には 1A510/pBU4371 をそれぞれスポットした。

【0094】形質転換株 1A510/pAMY33HSAE2 (AJ12578) と 1A510/pBU4371 (AJ12492) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託されている。その寄託番号は、1A510/pAMY33HSAE2 が FERM P-11806 で、1A510/pBU4371 が FERM P-11206 である。

【0095】

【実施例7】[全合成ヒト血清アルブミン遺伝子の枯草菌での発現 (2)]

大腸菌でのもう1つの発現プラスミドを図22のようにして構築した。即ち、まず実施例5で構築したプラスミ

21

ドpSDHASE12のtrpAターミネーターを含む0.3kb BamHI-HincII断片をpHSG299のBamHI-HincIIサイトに連結し、pKT91を構築する。次にpSDHASE12のtrpプロモーターを含む80bp EcoRI-ClaI断片と、ヒト血清アルブミン遺伝子を含む1.8kb ClaI-BamHI断片とをpKT91のEcoRI-BamHIサイトに連結し、目的のプラスミドpKT91HSAE4を得た。

【0096】次にこの発現プラスミドpKT91HSAE4で通常よく用いられる塩化ルビジウム法を用いて大腸菌HB101株を形質転換し、形質転換株HB101/pKT91HSAE4を得た。この株を実施例5と同様な培地で培養を行ったところ、やはり菌体内に顆粒が生成した。

【0097】実施例5と同様に顆粒を調製し、同様にヒト血清アルブミンの定量を行ったところ、生成量は80~90mg/L/O. Dであり、実施例5の生成量をさらに4倍以上上回るものであった。

【0098】HB101/pKT91HSAE4 (AJ 12577) は、工業技術院微生物工業研究所に寄託さ

22

れている (FERM P-11805)。

【0099】

【発明の効果】原核生物が好んで用いるコドンを多用するようにしてデザインした合成DNAを用いて目的とするヒト血清アルブミンを生産させる本発明は、cDNAを用いてヒト血清アルブミンを微生物に生産させる従来の方法の不完全さを是正し、より効率的な蛋白質生産を行う上で極めて重要なものである。

【0100】

10 【配列表】配列番号：1

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：cleavage-site

存在位置：21...26

特徴を決定した方法：S

20 配列

【0101】

23

24

配列表 (配列番号1)

10	20	30	40
5' AA GCTTGGGATG GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA			
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys			
50	60	70	80
GAC CTG GGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT			
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala			
100	110	120	130
CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC			
Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn			
150	160	170	180
GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA			
Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu			
200	210	220	230
AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT			
Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr			
250	260	270	280
CTT GCG ACC CTC CCG GAA ACC TAC GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT			
Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala			
290	300	310	320
AAA CAG GAA CCG GAA CCG AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC CAC			
Lys Gln Gln Pro Gln Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp			
340	350	360	370
AAC CCG AAC CTG CCG CCG CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC			
Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys			
390	400	410	420
AOC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC			
Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr			
440	450	460	470
GAA ATC GCA CCG CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC			
Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe			

[0102]

25

26

490 500 510 520
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala

 530 540 550 560 570
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp

 580 590 600 610 620
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CBT CTG AAA TGC GCT TCT CTC
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu

 630 640 650 660
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CGC CTG
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu

 670 680 690 700 710
 TCC CAG CGC TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val

 720 730 740 750 760
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GCG GAC CTT CTA
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu

 770 780 790 800 810
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT GCG GAC CTG GCG AAA TAC ATC TGC GAA AAC
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn

 820 830 840 850 860
 CAG GAC TCC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu

 870 880 890 900
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CCG
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro

 910 920 930 940 950
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG GCG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

{0103}

27 28

960 970 980 990 1000
TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010 1020 1030 1040 1050
TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060 1070 1080 1090 1100
CGC CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA GCG
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110 1120 1130 1140 1150
GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG
Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160 1170 1180 1190 1200
GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC AAA
Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Lys

1210 1220 1230 1240
CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CCG TAC ACC
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250 1260 1270 1280 1290
AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT
Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300 1310 1320 1330 1340
AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA
Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350 1360 1370 1380 1390
CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG
Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400 1410 1420 1430 1440
TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC
Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0104]

29

30

1450 1460 1470 1480
 TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT TGC TTC TCC GCT CTA GAG
 Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

 1490 1500 1510 1520 1530
 GTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT
 Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

 1540 1550 1560 1570 1580
 TTC CAC GCG GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA
 Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

 1590 1600 1610 1620 1630
 AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC
 Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

 1640 1650 1660 1670 1680
 AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA
 Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

 1690 1700 1710 1720
 AAA TGC TGC AAA GCT CAC CAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA CAA GCT
 Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

 1730 1740 1750 1760 1770
 AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GGC CTG TAATGATAGG
 Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

 1780
 ATCC 3'

【0105】配列番号：2

配列の長さ：1781

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸 合成DNA

配列の特徴

特徴を表す記号：cleavage-site

存在位置：21..26

特徴を決定した方法：S

30 配列

【0106】

31

32

配列表 (配列番号2)

10	20	30	40	
5' AA GCTTGGGATG GAC GCT CAC AAA TCC GAA GTT GCG CAC CGT TTT AAA				
Asp Ala His Lys Ser Glu Val Ala His Arg Phe Lys				
50	60	70	80	90
GAC CTG CGT GAG GAA AAC TTC AAA GCG CTG GTT CTG ATC GCT TTC GCT				
Asp Leu Gly Glu Glu Asn Phe Lys Ala Leu Val Leu Ile Ala Phe Ala				
100	110	120	130	140
CAG TAC CTT CAG CAG TGC CCG TTC GAG GAC CAC GTT AAA CTG GTA AAC				
Gln Tyr Leu Gln Gln Cys Pro Phe Glu Asp His Val Lys Leu Val Asn				
150	160	170	180	190
GAA GTA ACC GAA TTC GCT AAA ACC TGC GTA GCT GAC GAA TCT GCA GAA				
Glu Val Thr Glu Phe Ala Lys Thr Cys Val Ala Asp Glu Ser Ala Glu				
200	210	220	230	240
AAC TGC GAC AAA TCC CTG CAC ACC CTG TTC GGT GAC AAA CTG TGC ACT				
Asn Cys Asp Lys Ser Leu His Thr Leu Phe Gly Asp Lys Leu Cys Thr				
250	260	270	280	
GTT GCG ACC CTG CCG GAA ACC TAC GGT GAA ATG GCT GAC TGC TGC GCT				
Val Ala Thr Leu Arg Glu Thr Tyr Gly Glu Met Ala Asp Cys Cys Ala				
290	300	310	320	330
AAA CAG GAA CCG GAA CCG AAC GAA TGC TTC CTT CAG CAC AAA GAC GAC				
Lys Gln Glu Pro Glu Arg Asn Glu Cys Phe Leu Gln His Lys Asp Asp				
340	350	360	370	380
AAC CCG AAC CTG CCG CCG CTG GTT CGT CCG GAA GTC GAC GTA ATG TGC				
Asn Pro Asn Leu Pro Arg Leu Val Arg Pro Glu Val Asp Val Met Cys				
390	400	410	420	430
ACC GCA TTC CAC GAC AAC GAA GAA ACC TTC CTG AAA AAA TAC CTG TAC				
Thr Ala Phe His Asp Asn Glu Glu Thr Phe Leu Lys Lys Tyr Leu Tyr				
440	450	460	470	480
GAA ATC GCA CCG CGT CAC CCG TAC TTC TAC GCA CCG GAA CTG CTG TTC				
Glu Ile Ala Arg Arg His Pro Tyr Phe Tyr Ala Pro Glu Leu Leu Phe				

[0107]

33

34

490 500 510 520
 TTC GCT AAA CGT TAC AAA GCA GCT TTC ACT GAA TGC TGC CAG GCG
 Phe Ala Lys Arg Tyr Lys Ala Ala Phe Thr Glu Cys Cys Gln Ala

530 540 550 560 570
 GCT GAC AAA GCG GCA TGC CTG CTG CCG AAA CTG GAC GAA CTG CGT GAC
 Ala Asp Lys Ala Ala Cys Leu Leu Pro Lys Leu Asp Glu Leu Arg Asp

580 590 600 610 620
 GAA GGT AAG GCG TCT TCT GCA AAA CAG CGT CTG AAA TGC GCT TCT CTC
 Glu Gly Lys Ala Ser Ser Ala Lys Gln Arg Leu Lys Cys Ala Ser Leu

630 640 650 660
 CAG AAA TTC GGT GAA CGT GCA TTC AAA GCG TGG GCA GTT GCG CCG CTG
 Gln Lys Phe Gly Glu Arg Ala Phe Lys Ala Trp Ala Val Ala Arg Leu

670 680 690 700 710
 TCC CAG CCG TTC CCG AAA GCA GAA TTC GCA GAA GTG TCT AAA CTG GTT
 Ser Gln Arg Phe Pro Lys Ala Glu Phe Ala Glu Val Ser Lys Leu Val

720 730 740 750 760
 ACT GAC CTG ACC AAA GTT CAC ACC GAA TGC TGC CAC GGC GAC CTT CTA
 Thr Asp Leu Thr Lys Val His Thr Glu Cys Cys His Gly Asp Leu Leu

770 780 790 800 810
 GAG TGC GCA GAC GAC CGT GCG GAC CTG GCG AAA TAC ATC TGC GAA AAC
 Glu Cys Ala Asp Asp Arg Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Cys Glu Asn

820 830 840 850 860
 CAG GAC TCC ATC TCT TCT AAA CTG AAA GAA TGC TGC GAA AAA CCG CTG
 Gln Asp Ser Ile Ser Ser Lys Leu Lys Glu Cys Cys Glu Lys Pro Leu

870 880 890 900
 CTG GAA AAA TCT CAC TGC ATC GCA GAA GTA GAA AAC GAC GAA ATG CCG
 Leu Glu Lys Ser His Cys Ile Ala Glu Val Glu Asn Asp Glu Met Pro

910 920 930 940 950
 GCG GAT CTG CCG TCT CTG GCG GCT GAC TTC GTT GAA TCA AAA GAC GTG
 Ala Asp Leu Pro Ser Leu Ala Ala Asp Phe Val Glu Ser Lys Asp Val

[0108]

35 36

960 970 980 990 1000
TGC AAA AAC TAC GCA GAA GCA AAA GAC GTA TTC CTA GGT ATG TTC CTG
Cys Lys Asn Tyr Ala Glu Ala Lys Asp Val Phe Leu Gly Met Phe Leu

1010 1020 1030 1040 1050
TAC GAA TAC GCT CGT CGA CAC CCG GAC TAC TCT GTG GTT CTG CTG CTG
Tyr Glu Tyr Ala Arg Arg His Pro Asp Tyr Ser Val Val Leu Leu Leu

1060 1070 1080 1090 1100
CCG CTG GCA AAA ACC TAC GAA ACT ACC CTG GAA AAA TGC TGC GCA CCG
Arg Leu Ala Lys Thr Tyr Glu Thr Thr Leu Glu Lys Cys Cys Ala Ala

1110 1120 1130 1140 1150
GCT GAC CCA CAC GAA TGC TAC GCA AAA GTG TTC GAC GAA TTC AAA CCG CTG
Ala Asp Pro His Glu Cys Tyr Ala Lys Val Phe Asp Glu Phe Lys Pro Leu

1160 1170 1180 1190 1200
GTT GAA GAA CCG CAG AAC CTG ATC AAA CAG AAC TGC GAA CTG TTC GAA
Val Glu Glu Pro Gln Asn Leu Ile Lys Gln Asn Cys Glu Leu Phe Glu

1210 1220 1230 1240
CAG CTG GGT GAA TAC AAA TTC CAG AAC GCT CTG CTG GTT CCG TAC ACC
Gln Leu Gly Glu Tyr Lys Phe Gln Asn Ala Leu Leu Val Arg Tyr Thr

1250 1260 1270 1280 1290
AAA AAG GTA CCG CAG GTG TCT ACT CCG ACC CTG GTG GAA GTA TCC CGT
Lys Lys Val Pro Gln Val Ser Thr Pro Thr Leu Val Glu Val Ser Arg

1300 1310 1320 1330 1340
AAC CTG GGT AAA GTT GGC TCT AAA TGC TGC AAA CAC CCG GAA GCG AAA
Asn Leu Gly Lys Val Gly Ser Lys Cys Cys Lys His Pro Glu Ala Lys

1350 1360 1370 1380 1390
CGT ATG CCG TGC GCG GAA GAC TAC CTG TCC GTG GTG CTG AAC CAG CTG
Arg Met Pro Cys Ala Glu Asp Tyr Leu Ser Val Val Leu Asn Gln Leu

1400 1410 1420 1430 1440
TGC GTT CTG CAC GAA AAA ACC CCG GTT TCT GAC CGT GTA ACT AAA TGC
Cys Val Leu His Glu Lys Thr Pro Val Ser Asp Arg Val Thr Lys Cys

[0109]

37

1450 1460 1470 1480

TGC ACC GAA TCT CTG GTT AAC CGC CGT CCG TGC TTC TCC GCT CTA GAG

Cys Thr Glu Ser Leu Val Asn Arg Arg Pro Cys Phe Ser Ala Leu Glu

1490 1500 1510 1520 1530

CTT GAC GAA ACC TAC GTA CCG AAA GAA TTC AAC GCA GAA ACC TTC ACT

Val Asp Glu Thr Tyr Val Pro Lys Glu Phe Asn Ala Glu Thr Phe Thr

1540 1550 1560 1570 1580

TTC CAC GCG GAC ATC TGC ACC CTG TCC GAA AAA GAA CGC CAG ATC AAA

Phe His Ala Asp Ile Cys Thr Leu Ser Glu Lys Glu Arg Gln Ile Lys

1590 1600 1610 1620 1630

AAA CAG ACC GCT CTG GTG GAA CTG GTA AAA CAC AAA CCG AAA GCA ACC

Lys Gln Thr Ala Leu Val Glu Leu Val Lys His Lys Pro Lys Ala Thr

1640 1650 1660 1670 1680

AAA GAA CAA CTG AAA GCG GTG ATG GAC GAC TTC GCA GCT TTC GTA GAA

Lys Glu Gln Leu Lys Ala Val Met Asp Asp Phe Ala Ala Phe Val Glu

1690 1700 1710 1720

AAA TGC TGC AAA GCT GAC GAC AAA GAA ACC TGC TTC GCT GAA GAA GGT

Lys Cys Cys Lys Ala Asp Asp Lys Glu Thr Cys Phe Ala Glu Glu Gly

1730 1740 1750 1760 1770

AAA AAA CTG GTA GCT GCG TCT CAG GCT GCA CTG GCG CTG TAATGATAGC

Lys Lys Leu Val Ala Ala Ser Gln Ala Ala Leu Gly Leu

1780

ATCC 3'

38

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFokI認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4、5を示す図である。図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSA4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌

trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンブロットング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシーブルーでタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンブロットングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。

1. HB101全菌体蛋白
2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白
3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分
- M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】α-アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(Ala33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、Ala33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わ

す。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターpASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1μlを1回及び5回ナイロンメンブランにスポットし、抗ヒト血清アルブミン抗体でプロットした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図であ

る。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1から3を示す図である。図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4, 5を示す図である。図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6から8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

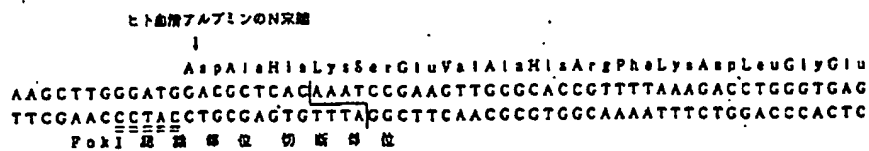
【図1】

```

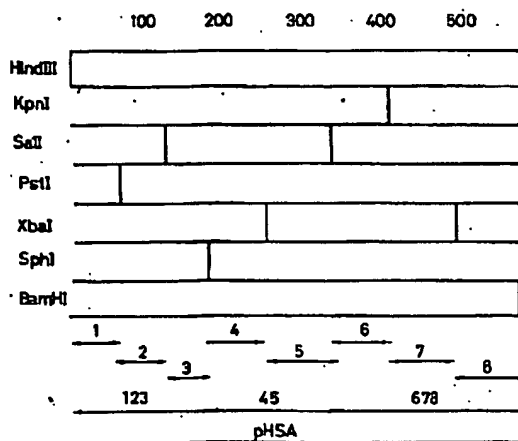
1' AACCTTGGCA TGGACGCTCA CAAATCGGAA GTTCCGCACC GTTTTAAAGA CTTGGGTGAG
GAAAACTTCA AAGCGCTCGT TCTGATCGCT TTCCCTCAGT ACCTTCAGCA GTGCCCGTTC
OAGGACCAAG TTAACCTCGT AAACGAAGTA ACCGAATTCT CTAAACCTCG CTTAGCTGAC
GAATCTGCAQ AAAACTCGGA CAAATCGCTG CACACCTGCT TCGGTGACAA ACTGTGCACT
GTTCCGACCC TCCCGGAAAC CTACCGTGAA ATGCTGACT GCTGCGCTAA ACAGGAACCG
GAACGCAAGC AATGCTTCCT TCAGCACAAA GACGACAAAC CGAACCTGCC GCGCCTCGTT
CCTCCGGAAG TCGACGTAAT GTGACCGGCA TTCCACGACA ACAGAGAAAC CTTCTTGAAA
AAATACCTCT ACCAAATCGC AGCCGCTCAC CGTACTTCT ACACACCGGA ACTGCTGTTT
TTCCCTAAAC GTTACAAAGC AGCTTTTACT GAATGCTGCC AGCCGCTGTA CAAAGCGGCA
TGCTGCTGCG CCAAACTGCA CCAACTGCTT GACGAAGGTA AGCGGTCTTC TGCAAAACAG
CGTCTGAAAT GCGCTTCTCT CCAGAAATTC GGTGAACGTG CATTCAAGGC GTGGCGACGT
GCGCGCTGCT CCGACGCTT CCGGAAAGCA GAATTCGGAO AAGTGTCTAA ACTGGTTACT
GACCTGACCA AAGTTCACAC CCAATGCTGC CAGCGCGACC TTCTAGAGTC CCGACACGAC
CGTGCGGACC TGCCGAAATA CATCTCCGAA AACCAAGACT CGATCTCTTC TAAACTCAAA
GAATGCTGCG AAAAAAGCGCT GCTCGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAAAT AGAAACGAGC
CAATGCTGCG CCGATCTGCC GTCTCTGGCG GCTGACTGCG TTGAATCAA AGACGTGTC
AAAAACTACG CAGAAGCAAA AGACGTATTC CTAGGTATCT TCTGTACCA ATACGCTGCT
CGACACCGCG ACTACTCTGT GGTCTGCTG CTGCGCTGCG CAAAAACCTA CCAAACTACC
CTGAAAAAAT GTGCGCGAGC GCGTGACCCA CAGCAATGCT ACCGAAAAAT GTTCGACGAA
TTCAAAACCG TGGTTGAAGA ACCGCAAGAC CTGATCAAAC AGAACTGCGA ACTGTTCAAA
CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAAGAGCT CTGCTGTTT GCGGTAAAGT TGGCTCTAAA
CAGGTCTCTA CTCCGACCTT CTTGGAAGTA TCCGCTAAC TGGGTAAAGT TGGCTCTAAA
TCTTGCAAAAC ACCCGGAAAG GAAACGTATG CCGTCCCGCG AAGACTACTT GTCCGTGCTG
CTGAAACGAG TGTGCGTTCT GCACGAAAAA ACCCGGTTT CTGACCTGCT AACTAAATGC
TGCAACCGAAT CTCTGTTTAA CCGCGCTGCG TGTCTTCTCG CTCTAGAGGT TGACGAAAC
TACGTACCGA AAGAATTCAA CCGCAGAAAC TTCACTTTCC ACCCGGACAT CTGCAACCTG
TCCGAAAAAG AACGCCAGAT CAAAAACAG ACCGCTCTG TGGAACTGGT AAAACACAAA
CCGAAAGCAA CCAAGGAGCA ACTGAAAGCG GTGATGACG ACTTCGCAAC TTCTCTAGAA
AAATGCTGCA AAGCTGACCA CAAAGTAAAC TCGTTGCTG AAGCAAGGTAA AAAACTGCTA
GCTGCTGCTC AGGCTGCACT CCGCTGTAAT CATAGCATC 5'

```

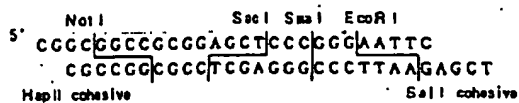
【図2】



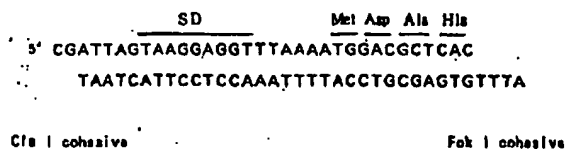
【図3】



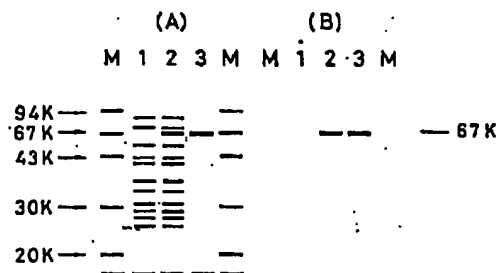
【図11】



【図5】



【図7】



プロック！

PSIX

ブロック

S&I

プロダク

SalI
TGCAGCTAATGCTGCAAGCCGATTCGCACGACAACGAAGAAACCTTTCTGAAAATAATAC
CGATTACAGCTGCGCTAAGGTCGTCTTCTCTTTTGGAAAGCACTTTTATATGCAGATGCT
CTGTACGAATTCGACGCGCTCACCGCTACTTTACGACAGCGGAATCTGCTGTTTCTG-
TTAGCTGTCGGCAGTGGGCATGAAGCTGTGCGCTTACGACGACAAGCGATTTCGA
CTAAAGCTTCAAGAGCGCTTCACTGAATGCTCGCAGCGCGCTGCAACAAGCCGCAATG
ATGTTTCTCGTAAGCTTATGACAGCTTACAGCGCTGAGCTGTTTGGC SphI

ブロック4

SpbI
CCTGCTGCCAAACTGGCAAGCTCGCTGACCAAGCTAAGGGCTCTTCTGCCAAA
GTACGGACAGCGCTTTGACCTGTTGACCACTGCTTCCATTCCGCAAGAGAGCTTTTCTGGCAG
CAGCGCTGCAAATGCCCTTCTCTCCAGAAAATTCGTCAAGCTTCATTCAAG
ACTTTACGGCAAGAGAGGCTTTTAAGCCAGTTTGGCACTAACTTCCGACCGCTC
GTGGCACTGTCGGCTCTGTCAGCGCTTCCGAAGCAAGCTTCCAGAGCT
AAGCGCCCAACAGCTGCGCAAGCGCTTTGCTCTTAAGCTTTCAACAGATTG
GCTTAACTGCTACTGACATGCAAGAAAGTTCAACAGGAATGCGCAAGCGCGCTT TbaI
ACCAATGCACTGCACTGCTTTCAAGTCTGCTTACGACGCTCGCGCTGGAAGATC

プロジェクト 5

XbaI
CTAGAGTTCGCAGACGACCGTCGCGACCTGCGGAAATACATCTCGGAAATCCAGGACTTCAT
TCAGCGCTCTGCTGCACCGCTGACCGCTTTATGTCGACCGCTTTGTCCTGAGTACAGAGAT

CTCTTCTAAATCGAAGAGTCTGTCGAAAAACCGCTGCTGGAAAAATCTCACTGCATCCGAGAA
TTCATCTGCTTATACGACGCTTTTTCGGGACGACCTTTTATGACGCTAGCTGCTTCATCTTTT

GTAGAAACCGACGAATATCTGGGATGCTTGGCGCTCTGCTGGTCACTGCTGTGATCAAAAGAA
GCTGCTTTATCGCGCGCTAGACGGCAGAGACCGCGGACATGAAGAACTATGTTTCTGCACAGCTT

GTCTGCAAAATCTCGCAGCAAGCAAAACAGTATTCCTAGCTATGTTCTCTGCAAGTATCCGCTCG
TTTATGCTGCTCTGCTTTCTCTGCTGACGATGCTAGCAACGAGCATGCTTATACCGACAGCT

GTCTGCAAAATCTCGCAGCAAGCAAAACAGTATTCCTAGCTATGTTCTCTGCAAGTATCCGCTCG 3a [E]

圖 4B

·圖 4A

[illegible]

Хрвѣ

[illegible]

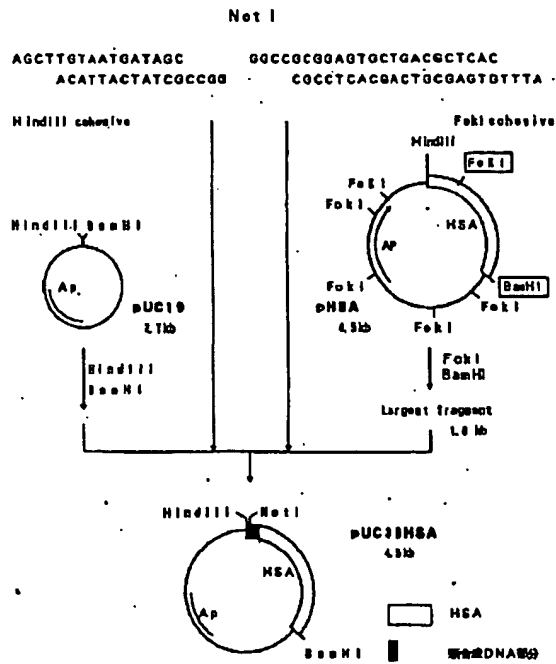
X 1 0

7D991
 TTTT
 TCACTTTC
 CAAAAAAC
 ACCAAACAA
 AAAAAATG
 TAAAAAACT

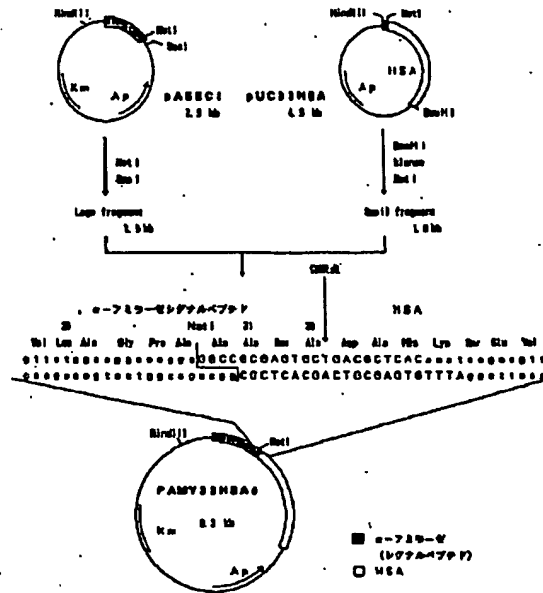
S A M H I

4c

【図13】

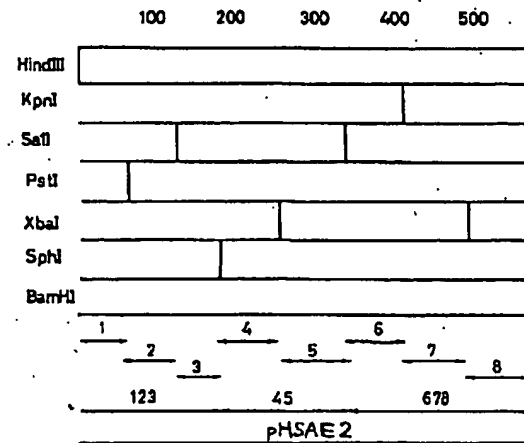
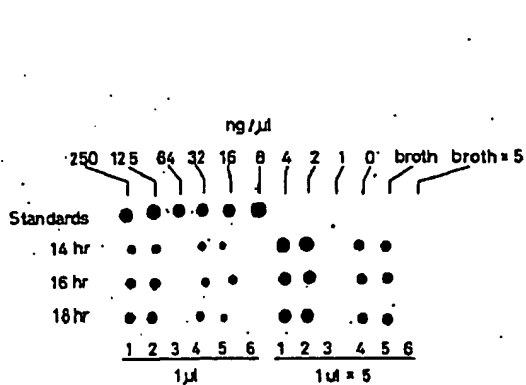


【図14】



【図17】

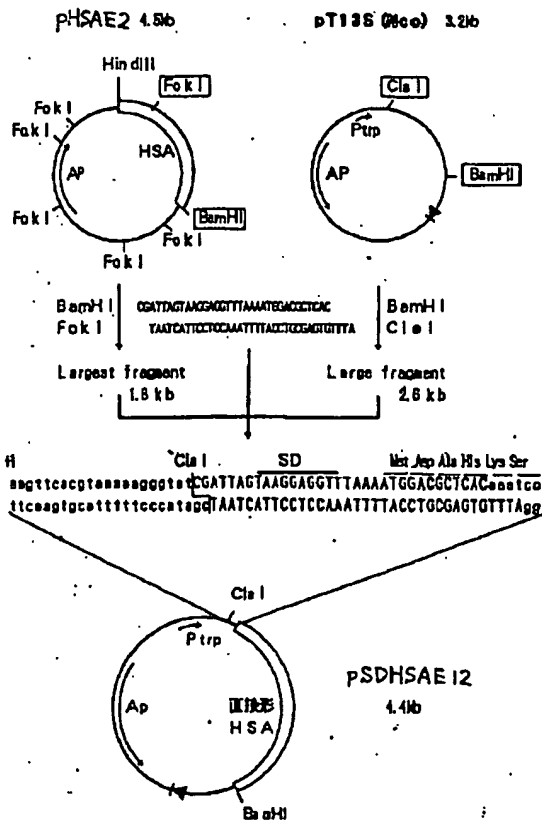
【図15】



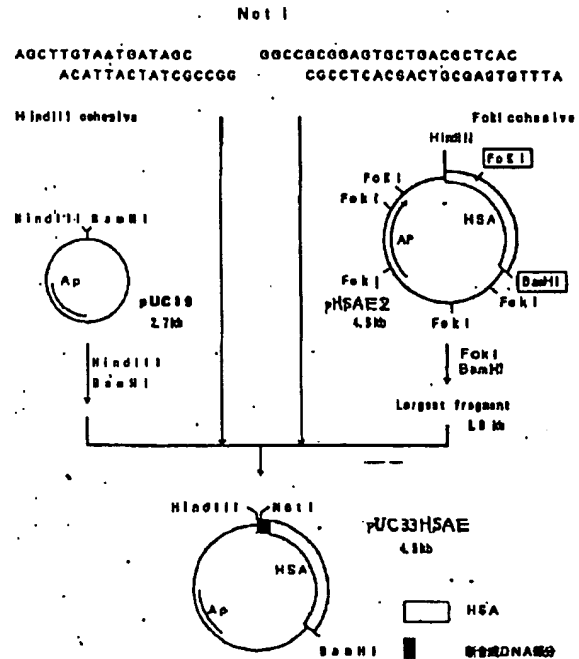
【図16】

1' AAGCTTGGGA TGGACGGTCA CAAATCCGAA GTTGGCCACC GTTTTAAAGA CCTGGGTGAC
 GAAAACCTCA AAGCGCTGCT TGTGATCGGT TCGCTCAGT ACCTTCAGGA GTGCGCTTC
 GAGGACCAAG TTAACCTGCT AAACGAACTA ACCGAATTCG CTAAACCTTC CGTAGCTGAC
 GAATCTGAG AAAACTCGGA CAAATCCCTG CACACCTGT TCGGTGACAA ACTGTGCACT
 GTTGGCAAGC TGGCCGAAAC CTACGGTGAA ATGCTGACT GCTGGCTTAA ACAGGAAACCG
 CAACGCAACG AATGCTTCT TACGACAAA GACGACAAAC CGAACCTGCC CGGCTGTGT
 CGTCCGCAAG TCGACGTAA GTGACCCGCA TTCCACGACA ACAGGAAAC GTTCTGTAAA
 AAAATCTCTG ACGAAATCGC ACGCCGTCAC CCGTACTTCT ACACACCGGA ACTGCTGTTC
 TTGCTTAAAC GTTACAAAAG AGCTTTCACT CAATGCTGCC AGGCGCTGTA CAAAGCGGCA
 TCGCTGCTGC CAAAACCTGA CCAACTGCTT CACGAAGCTA AGGCTGCTTC TCGAAAACAG
 CGTCTGAAAT GCGCTTCTCT CCAGAAATTC CCGTAACTTC CATTCAAAAG GTGGGCAOIT
 CCGGCTCTGT CCGACGCTTT CCGAAAAGCA GAATTCGCGA AAGTCTCTAA ACTGCTTACT
 GAGCTGACCA AAGTTCACAC CGAATGCTGC CACGCGGACC TTCTAGAGTG CCGACACGAC
 CGTCCGGAAC TGGCGAAATA CATCTCGGAA AACGAGGACT CCACTCTCTT TAAACTGAAA
 CAATGCTGCG AAAAGCGCTT GCTCGAAAAA TCTCACTGCA TCGCAGAGT AGAAAACGAC
 CAAATCCGCG CGGATCTGCC GTCTCTGCGG GTGACTTTC TCGAATCAAA AGACGTGTGC
 AAAAATCTAG CAGAAAGCAA AGACGTAATC CTAGGATATG TCTGTATGTA ATACGCTGCT
 CGACACCGAG ACTACTCTGT GGTCTGCTG CTGCGCTGTG CAAAACCTTA CGAAACTAAC
 CTGGAATAAT GTTGGCGAGC GGTGACCCCA CACGAATGCT ACGCAAAAGT GTTGGACGAA
 TCAAAACCGG TGGTTGAAAG ACCGACGAAC CTGATCAAA AGAACTGCGA ACTGTTGCAA
 CAGCTGGGTG AATACAAAT CCAGAACGCT CTGCTGCTTC GTACACCAA AAAGGTACCG
 CAGCTGCTTA CTCCGACCTT GCTCGAAATA CCGTGGCGCG AAGACTACTT GTCCGTGGTG
 TGTGCAAAAC ACGCGGAAAG CAAACGATG CCGTGGCGCG AAGACTACTT GTCCGTGGTG
 CTGAACCAAG TGTGCTGTCT CCAAGAAAAA ACCCGCTGTT CTGACCGGTG AACTAAATGC
 TGCACCGAAT CTCTGCTTAA CCGCGCTGCG TGTGCTGCTG CTCTAGAGTG TCACGAAAGC
 TACGTACCGA AAGAAATCAA CCGCAAAACC TTCACTTTC ACAGCGGACAT CTGACCGCTG
 TCCGAAAAAG AACCGCAGAT CAAAAAACAG ACCGCTCTG TGGAACTGGT AAAACACAAA
 CCGAAACCAA CCAAAAGACA ACTGAAACCG CTGATGGAGC ACTTCGCAAG TTCTGTAGAA
 AAATGCTGCA AAGCTGACCA CAAAGAAACC TCGTTCCTGT AAGAAAGGTA AAAACTGOTA
 GCTCCGCTTC AAGCTGCACT CGGCTGTAA TATAGGATC C 3'

【図19】



【図20】



ブロック1

プロ・タ

プロジェクト

プロダクト

プロジェクト

‘ 圖 18 B

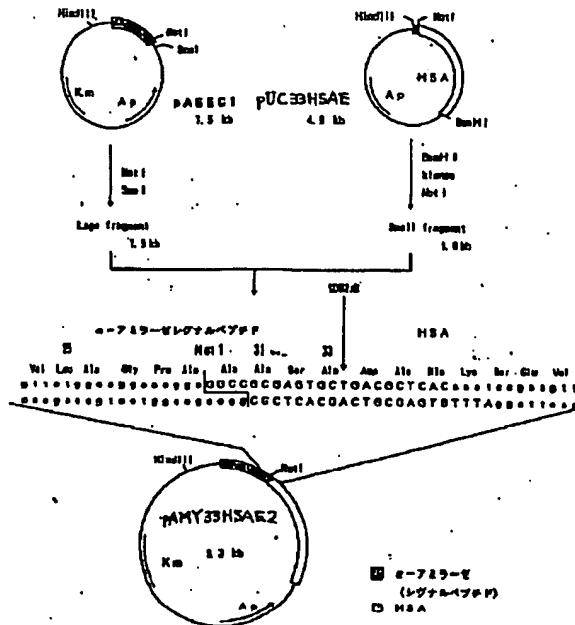
70,71

70-91

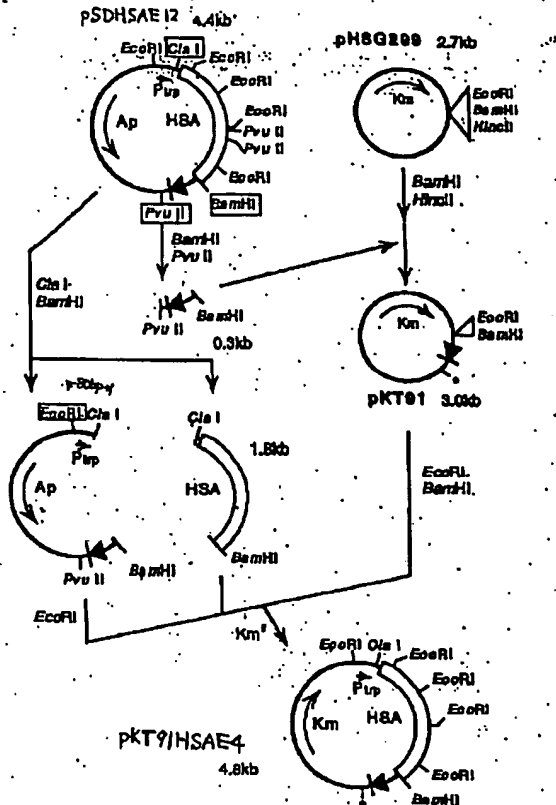
707

—609—

【図21】



【図22】



【手続補正書】

【提出日】平成3年8月22日

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図2】ヒト血清アルブミンのN末端付近に単一の制限酵素切断部位を導入するために配置したFokI認識部位と切断部位を示す図である。

【図3】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAが保持する領域を示す。

【図4A】図4Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロッ

ク1を示す図である。

【図4B】図4Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック2を示す図である。

【図4C】図4Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック3を示す図である。

【図4D】図4Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4を示す図である。

【図4E】図4Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック5を示す図である。

【図4F】図4Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6を示す図である。

【図4G】図4Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック7を示す図である。

【図4H】図4Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック8を示す図である。

【図5】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌の発現ベクターに接続するために作製した合成DNAを示す図である。なお、SDは、リボソーム結合部位を表す。

【図6】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSA4の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図7】ポリアクリルアミド電気泳動図及びウェスタンブロットング図である。詳細に述べると(A)はSDSポリアクリルアミド電気泳動後、クーマシーブルーでタンパク質を染色した図である。また(B)は(A)の1/30量の蛋白を用いて同様の電気泳動後、ゲル内の蛋白をナイロンメンブランにエレクトロトランスファーし、抗ヒト血清アルブミン抗体を用いてウェスタンブロットングした図である。図中の1, 2, 3, Mの略号は以下の通りである。1. HB101全菌体蛋白2. HB101/pSDHSAE12全菌体蛋白3. HB101/pSDHSAE12顆粒画分M. 分子量マーカー

【図8】精製顆粒蛋白のアミノ酸配列を示す図である。Observedは実際に観察された配列、Predictedは予定した配列を示す。

【図9】シャトルベクターpBU4371の構築を示す図である。

【図10】 α -アミラーゼの分泌に必須であり分泌時には切り離される、amyEのシグナルペプチドの切断点(A1a33)付近のアミノ酸配列及びDNA配列を示す図である。なお、矢印は、A1a33をコードする配列をGCTからGCCに置換することによってNotI部位が生ずること、及びシグナルペプチド切断点を表わす。

【図11】分泌ベクター構築のために作製した合成DNAを示す図である。

【図12】分泌ベクターPASEC1の構築図である。

【図13】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図14】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSA4の構築図である。

【図15】1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY33HSAE2及び1A510/pBU4371の培養14, 16, 18時間目の培養上清1 μ lを1回及び5回ナイロンメンブランにスポットし抗ヒト血清アルブミン抗体でブロットングした図である。Standardsは、SIGMAのEssential globulin free HUMAN Albuminを用いた。Brothの位置には、培地をスポットした。図中の1, 2, 4, 5の位置には1A510/pAMY33HSA4または1A510/pAMY3

3HSAE2を、3, 6の位置には1A510/pBU4371をそれぞれスポットした。

【図16】本発明者らが設計し、実際に全合成して構築した、ヒト血清アルブミンをコードするDNA配列を示す図である。

【図17】遺伝子中の制限酵素部位の配置を示す図である。なお、矢印はブロック1からブロック8各々の領域と、3つの中間的ブロックの領域、及びpHSAE2が保持する領域を示す。

【図18A】図18Aはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック1を示す図である。

【図18B】図18Bはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック2を示す図である。

【図18C】図18Cはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック3を示す図である。

【図18D】図18Dはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック4を示す図である。

【図18E】図18Eはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック5を示す図である。

【図18F】図18Fはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック6を示す図である。

【図18G】図18Gはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック7を示す図である。

【図18H】図18Hはヒト血清アルブミン遺伝子構築のため、DNA合成機で合成したDNAオリゴマーのブロック8を示す図である。

【図19】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpSDHSAE12の構築手順を示す図である。なお、プラスミドpT13S(Nco)は、大腸菌trpプロモーターを含む公知のプラスミドである。

【図20】pASEC1に接続するためのヒト血清アルブミン遺伝子の構築図である。

【図21】ヒト血清アルブミンを枯草菌で分泌するためのプラスミドpAMY33HSAE2の構築図である。

【図22】構築したヒト血清アルブミンを大腸菌で発現するプラスミドpKT91HSAE4の構築手順を示す図である。

【手続補正2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正内容】

【図 1】

[illegible]

【図 2】

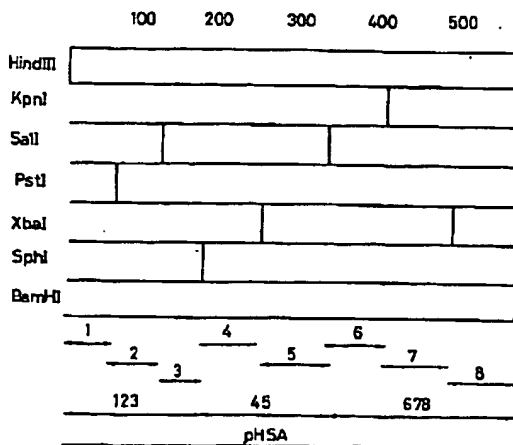
ヒト血清アルブミンのN末端

↓

AspAlaHisLysSerGluValAlaHisArgPheLysAspLeuGlyGlu
AAGCTTGGGATGGAGCGGTCACTAAATCCGAAGTTGCGCACCGGTTTTAAAGACCTGGGTGAG
TTCCGAACCTCTACCTGCGAGTGTTTAGGCTTCAACCGCGTGGCAAAATTTCTGGACCCACTC

FokI 切断部位 切断部位

【図 3】



【図 4 A】

70991

Hind III

AGCTTTGGGATGGACGCTCAGAAATCCGAAGTTGGCGACCTTTTAAAGACCTGGCTGAGGAA
ACCTTACCTTCGAGCTTTTACGCTTCACCGGTGGCGAAATTTCTGGACCTCACTCTTTGAAGTT

AACCTC.AAAGCCCTGGTCTGATGCTTTCCGCTCACTACCTTCAGCAGTGGCCGCTTCAGGA
TTCGCGCAAGACAGTCAAGCAAGCGAGTCAAGCACTCTCAAGCGCAAGCTCTTGTCGAAT

CCACGTTAACTGTAAACGAGAGCAACCGAATTCGCTAAACGCTGGTAGCTGACGAATTCG
TGGACATTTGGCTTATTGGCTTAAGCAATTTTGGCAGCGATCAGCTGCTTAC

Page 1

【図 4 B】

[illegible]

【例4 D】

ブロック4

SphI
CTCTGTCGGCAACTGGACGAATTGCTGACGAAGGTAAAGCGTCTTCTGCAAAA
GTACGACGACGGCTTTGACCTGCTTACGCACTGCTTCAATCTCGGCAAGACGTTTGTGCGAG
CAGGCTTCTGAATGCGCTCTCTTCGCAAAATTCGGTGAAGCTGCATTCAAGAG
ACTTTACGCGACGACAGAGCTCTTAAAGCACTTGCAGCTAAGTTTGGCACCGCTC
GTGGGCACTGTACGCGCTGACGCTCTCTTCGCAAGCAGAAATTCGCAAGT
AAAGCGGGGACAGGGTGGCAAGGGCTTGTCTTAAGCGCTCTTCACAGATTTC
GTCTAAATCTGTTACTGACTCTGCAAGAAATCTACAGCGAATCTGCGCCAGCATCT
ACCAATGACCTGCAAGCTTTCAAGTGTGGTACGAGCTGGCGCTGGCAAGT

XbaI

70,25

XbaI
 CTAGAGTCCGACGACGACCGTCCGGACCTGGCAATACATCTGCGAAACAGGACTCCAT
 TCACCGCTCTGCTGGCAGCGCTCGACCGCTTATGTAGACGCTTTTGGTCTCAGGATAGAGAT

 CTCTTCTAAATGAAGAATGCTGCAAAAACCGCTGTCGAAAAATCTCACTGCATCCGACAA
 TTGACTTTCTTACGACGCTTTTGGCAGCAGCTTTTATAGATGACGTAGGCTTTCATCTTT

 GTAGAAACGACGAATATCCGCGGATCTGCGGCTCTCTGGCGGTGACTGTTGTAATCAAAAGAC
 GGTGCTTTACGGCGCTCAAGACGAGACCGCCGACCTGAAGCAACTTACTTTTCTCGACGCTT

 GTGTGCAAAATACGACGAAGCAAGACGATATTCAGTATGTTCTGTACCAATACCGTGG
 TTGATGCGCTTCTGTTTCTGCTCAATAGGATCATCAAGACGACATCTTAATCGACAGCT

70.86

[illegible]

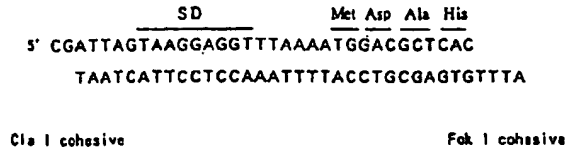
70,21

[illegible]

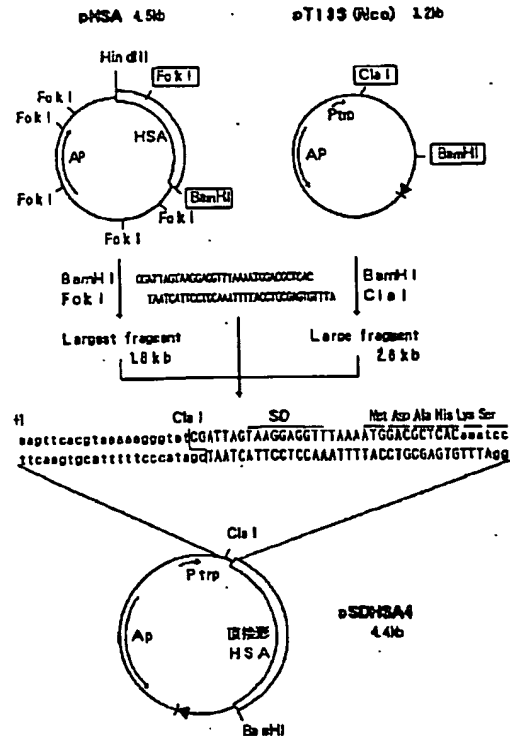
70,11

[illegible]

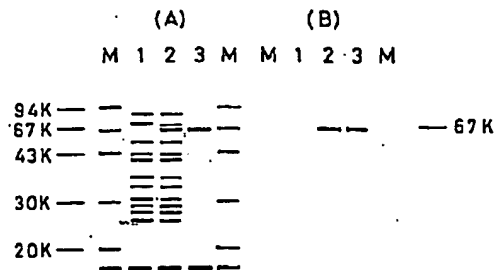
【図5】



【図6】



【図7】

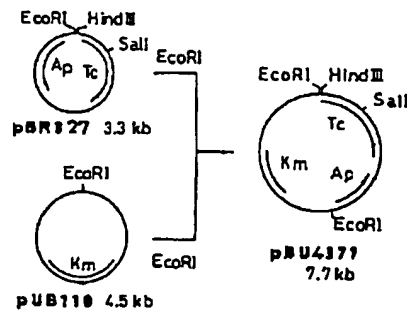


【図8】

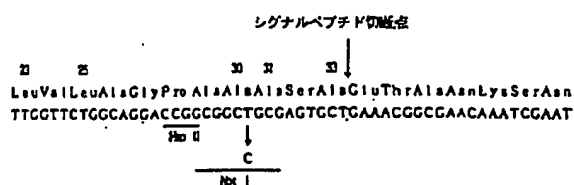
Observed : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-
 Predicted : Met-Asp-Ala-His-Lys-Ser-Glu-Val-

Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly
 Ala-His-Arg-Phe-Lys-Asp-Leu-Gly

【図9】

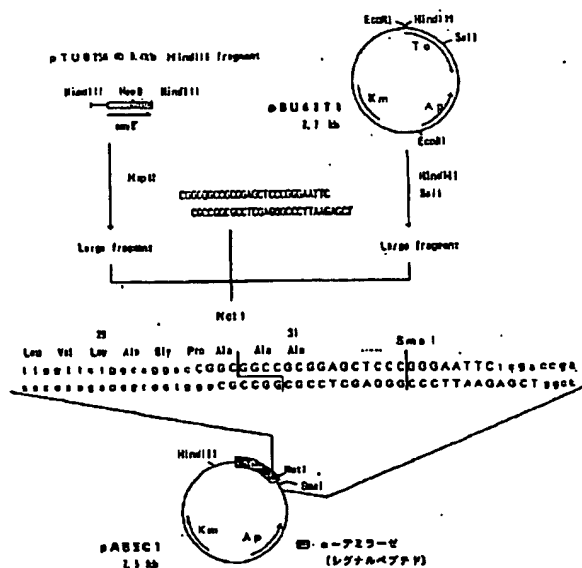


【図10】

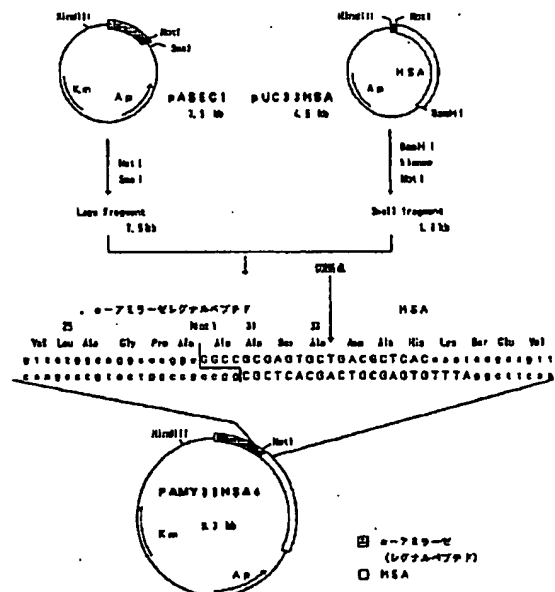


※ 数字はN末端からのアミノ酸位置

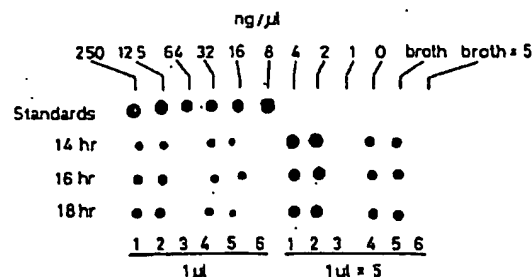
【图 12】



【图 14】



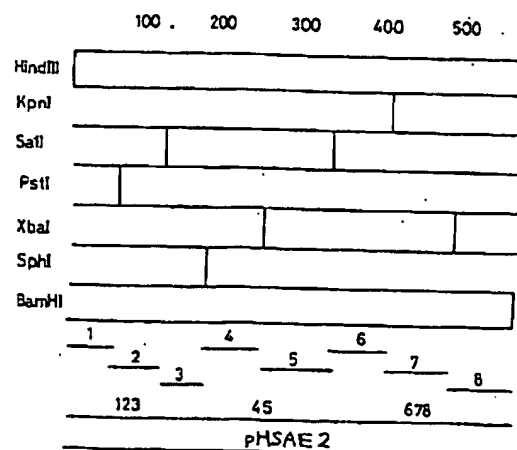
【例 18A】



【例 16】

1' AAGCTTGGGA TGCACGCTCA CAAATTCGAA GTTGGCGACC GTTTTAAAGA CCTCGGTGAC
 GA AAACTTCA AAGCGCTGCT TCTGATCOET TCCGCTCAGT ACCTTCAAGT GTGCCCGTTC
 GACGACCACT TTAACCTGGT AAATCGAAGTA ACCGAATTGC CTATAAACCTG CGTAGCGTAC
 GAATCTGCAG TGGACCTGCGA CAAATCCCTCT CACACCTCTGT TCGGTGTCAA ACTGTGCACT
 GTTCGCAACC CCGCGGAAC TACTCGGTGAA ATGGCTGACT GTGCGGCTAA ACAGGAACCC
 GAACCCCAAC AATCGTTTCT TCAGACAATA GACGACAACC CGAACCTGCC CCGCTGTGT
 GTCTCGGGAAG TCAGACGTAAT GTGACACGCA TCCACAGCA CAGGAACAA TTTCTGTAA
 AAATCACTGT ACGAAATCGC ACGCGCTGAC CCGTACTTCT ACGCAGCGGA ACTGTGTGT
 TTGCTTAAC ATTTACAGAAG AGCTTTCATG GAAATCTGCE AGCGGGCTGA ACTGTGTGT
 TCGCTGCTGC CBAACCTGCA CGAACCTGCC GACGAAAGTA ACGCGTCTTC TCGAAAACGT
 CGTCTGAAT CCGCTTCTCT CCAGAAATTC GTGAAACCTG CATTCAAGTG GTGGCGACCT
 CGCGCGCTGT CCGACGCGTT CCGGAAATTC GAAATCCGAC GATTTGTCTAA ACTGGTACT
 GACCTGACCA AACTTCAAC CCAATCTGTC CACCGCGACT TTCTAGACTT CCGACAGAC
 CTCTCGCGTC TGCCGAATA CATCTGCGAA AACCAAGCAT CCATCTCTTC TAAACTGAAA
 GAACTGCTGC AAAAAGCGCT GCTGCTGCGC GTCTACTGCG TCGCAATCAA ACAGAAACGC
 GAAATGCGGG CCGATCTGCC GTCTCTATGT CTACGTATGT TCTGTCAAG ATACGCTTCT
 AAAAACTACG CAGAAGCAAA ACAGCTATTC CTACGTATGT TCTGTCAAG CAAACTACCT
 CGACACACCG ACTACTCTGT GGTCTGTGCT GCGCGCTGG CAAAACCTA CGAACTACCT
 CTGGA AAAAT GGTGCGCTGT GGTGACCA CACGAAATGT CACCAAAAGT GTTCACGAA
 TTCAAACACG TGTTTCAAGT ACCCAACAC CTGATCAAAC AGAATTCGCA ACTGTTGCAA
 CAGCTGGGTG AATACAAAT CACAGAACCT CTGCTGGTTC GCTACACCAA AAGTTGACCG
 CAGGTGTCTA CTGCGACCTT GGTGGAAGT TCCCTTAAGC TGGGTAAATG TGCTCTAAA
 TGTCTCAAA ACCCGGAAG CAGACGTA GCGTGTGCG AGACACTCT CTGCGGTGT
 CTGAACGAGC TGTGCTTCT CGCGCAAAAA AGCCGCTTT CTGACCGTGT AACTAAAAG
 TGCAACGAAAT TGTGCTTAA CCGCGCTTCC TTCACTTTTC ACTGCTCTG TCAGAAACCG
 TACCTACCGA AAGATTTCAA CCGCAAAAC ACCGCTCTGC ACAGGACCT CTGCAACCTG
 TCGCAAAAAA AACCGCAAGT CAATAAACCG GTGATGACG TCGATGACG AACTTCGAC
 CCGAAGACAA CCAAGGAACA ACTCAAAAC TGCTTCTGTA AAGAGGTAA C' 1'
 AATGCTGCA CAGCTCAAGA CAGGAACAC TGCTTCTGTA AAGAGGTAA C' 1'
 TGTGCTCTC AGGTCGAACT GGGCTGTAA TGATAGGATG C' 1'

【图 17】



【图 18B】

70472

Psi I

GAAAACTGGCAAAATCCCTGCACACCTGTTGGGTACAAACTGTGCACTTTGCGACCTCGCG
ACGCTTTTGGCGCTTTTAGGCACTCTGGGCAAGCACTGTTTGCACCTGCACAACTCT

GAAACCTACCGTGAATGGCTGACTGCTGGCTAAACAGGAACCGGAACGCAAGTAATCTTCT
GGGACGCGCTTTGCAATGCCATCTACCGAAGTACGACGCGGATTTGTCTTGGCCTTGGCTGCTT

TCAGCAAAAGACCGACAACCCGAACTGGCGCGGCTGGTCTGTCCGAAC
ACGAAGCAAGCTGTGTTTCTGCTTGGGCTTGCAGCGCGCGCAACGACAGCTTCACT

Sac I

【図18C】

プロック3

SalI

TCGACGTAATGTCACCGGATTCACGACAGCAAGAACCTTCTGAAAAATAC
 GCATTACAGCTGGGCTAAGGTGCTGTTCTTCTTTGGAAGGACTTTTATGGACATGCT
 CTGTACGAAATGCGACGGCCCTACCGCTACTTCTACGGACCGGAAC7GCTGTTCTTG
 TTACGGTGGCGCAGTGGGATCAAGATGCGTGGCTTCACGACAGCAAGGCGATTGGCA
 CTAAACGTTACAAAGCAGCTTCACTGAATGCTGCGAGGCGCTGACAAAGCGGCATG
 ATGTTTCTGCGAAGTCACTTACGACGCTCGCGGACTGTTTGGCC SphI

【図18D】

プロック4

SphI

CCTGTGCGCAACTGGACCACTGCTGACGAGGTAAAGGCTTTCTGCAAAA
 GTACGCGACGACGGGTTTGACCTGCTTGACGCACTGTTTCAATTCGCGACAGAGGCTTTTCTCCAG
 CAGGCTCTGAAATGCGCTTCTCTCCAGAAATTCGGTGAACGTGATTCAAAGC
 ACTTTACGCGAAGAGAGGTCTTTAAGCGACTTGAAGTAAGTTTGGACCGGCT
 CTGCGCAGTTGCGGCGCTGTCGACGGCTTCCGAAAGCAGAAATTCGACAGAACT
 AAGCGCGGACAGGCTGCGAAGGCGTTTGGCTTTAAGCGCTTCTTCAAGATTG
 GTCTAAACTGTTACTGACCTGACCAAGTTTACACCGAATGCTGCGACGGCGACCTT XbaI
 ACCAATGACTGCACTGGTTTCAAGTGTGGCTTACGACGCTGCGGCTGCAAGATC

【図18E】

プロック5

XbaI

CTAGAGCTGCGCAGACGCGTGGGACCTGGGCAATACATCTGCGAAACGAGGACTCCAT
 TCACGGCTCTGCTGCGACGCTGCGACGCTTTATGTAGAGCTTTTGTCTGAGGTAGAGAGAT

CTCTTCTAACTGAAGAAATGCTGCGAAAAACGGCTGCGAAAAATCTCACTGCATCGCAGAA
 TTCACTTTCTTACGACGCTTTTGGCGACGACTTTTACAGTGACGTAGGCTTTCATCTTTT
 CTAGAAAAAGCAGAAATGCGCGGATCTGCGCTCTCTGCGGCTGACTTGGTTGAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGGCGGCTAGACGGCAGAGACGGGCGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 GTGTGCAAAACTACGAGAAAGCAAAAGCACTATTCTAGGTATGTTCTCTACGAATACGCTCG SphI
 TTGATGCGCTTCTGTTTCTGCTAAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGCAGCT

【図18F】

プロック6

SphI

CTGCGGCTCTGCTGCGACGCTTGGCGACGACTTTTACAGTGACGTAGGCTTTCATCTTTT
 CTAGAAAAAGCAGAAATGCGCGGATCTGCGCTCTCTGCGGCTGACTTGGTTGAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGGCGGCTAGACGGCAGAGACGGGCGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 GTGTGCAAAACTACGAGAAAGCAAAAGCACTATTCTAGGTATGTTCTCTACGAATACGCTCG SphI
 TTGATGCGCTTCTGTTTCTGCTAAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGCAGCT

【図18G】

プロック7

SphI

CATGCGGCTCTGCTGCGACGCTTGGCGACGACTTTTACAGTGACGTAGGCTTTCATCTTTT
 TCAACCGAATGCTGCGGATCTGCGCTCTCTGCGGCTGACTTGGTTGAATCAAAAGAC
 GCTGCTTTACGGCGGCTAGACGGCAGAGACGGGCGACTGAAGCAACTTACTTTTCTGACAGCTT
 ACATTGATTTTCTGCTAAGGATCCATACAGGACATGCTTATGCGAGCAGCT SphI

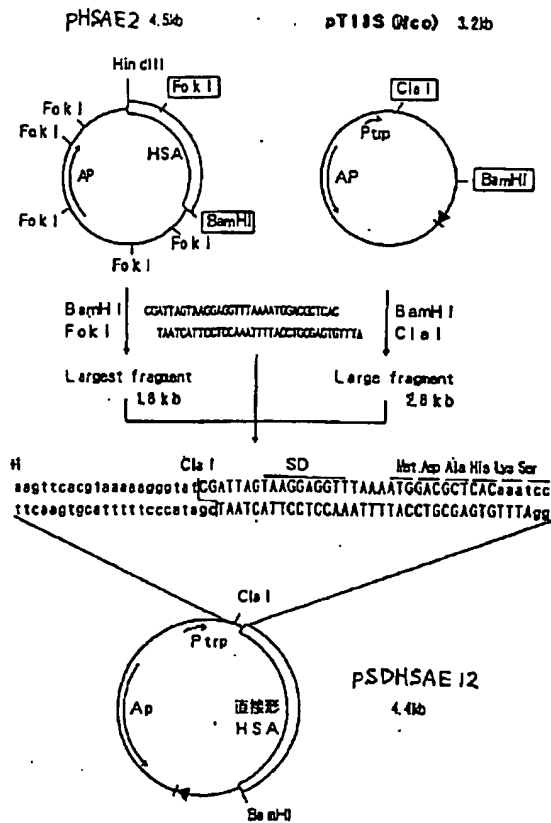
【図18H】

プロック8

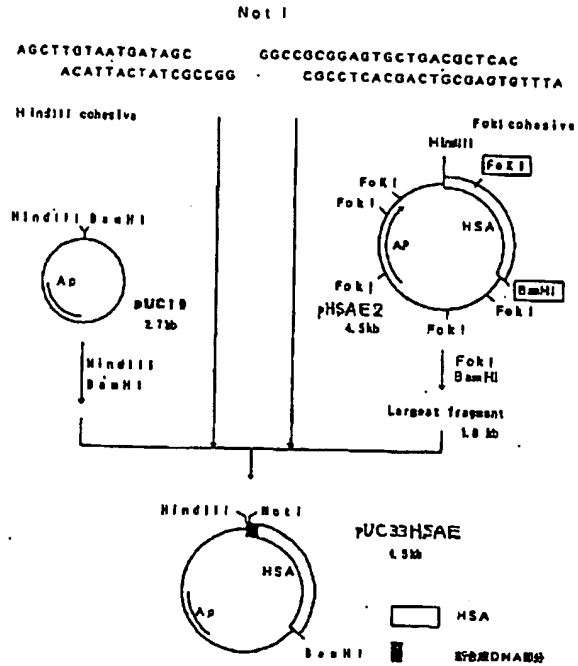
SphI

TCGACGTAATGTCACCGGATTCACGACAGCAAGAACCTTCTGAAAAATAC
 GCATTACAGCTGGGCTAAGGTGCTGTTCTTCTTTGGAAGGACTTTTATGGACATGCT
 CTGTACGAAATGCGACGGCCCTACCGCTACTTCTACGGACCGGAAC7GCTGTTCTTG
 TTACGGTGGCGCAGTGGGATCAAGATGCGTGGCTTCACGACAGCAAGGCGATTGGCA
 CTAAACGTTACAAAGCAGCTTCACTGAATGCTGCGAGGCGCTGACAAAGCGGCATG
 ATGTTTCTGCGAAGTCACTTACGACGCTCGCGGACTGTTTGGCC SphI
 CCTGTGCGCAACTGCGGCGCTGTCGACGGCTTCCGAAAGCAGAAATTCGACAGAACT
 AAGCGCGGACAGGCTGCGAAGGCGTTTGGCTTTAAGCGCTTCTTCAAGATTG
 GTCTAAACTGTTACTGACCTGACCAAGTTTACACCGAATGCTGCGACGGCGACCTT XbaI
 ACCAATGACTGCACTGGTTTCAAGTGTGGCTTACGACGCTGCGGCTGCAAGATC

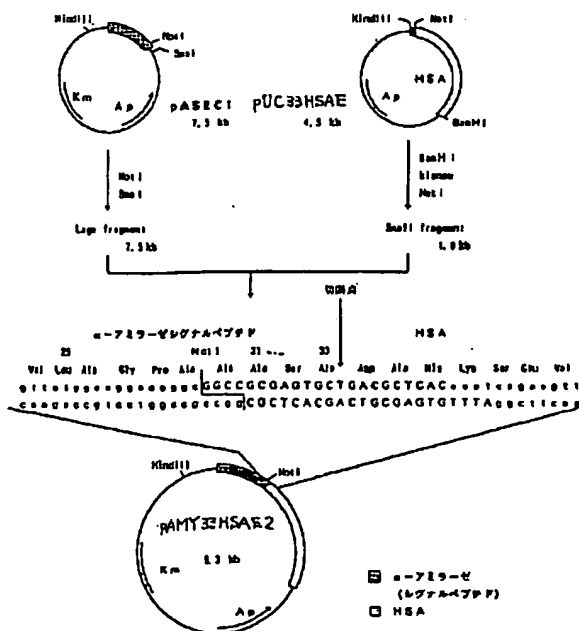
【図19】



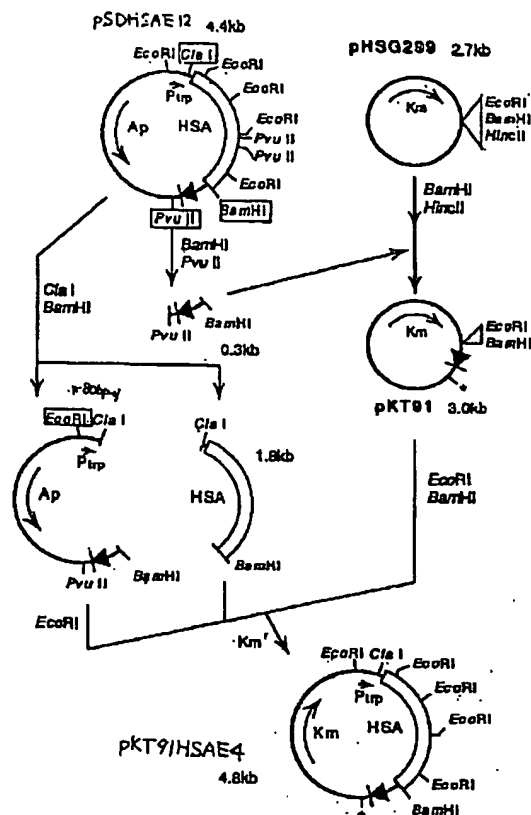
【図20】



【図21】



【図22】



フロントページの続き

(51) Int. Cl.⁵

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 N 1/21
 C 1 2 R 1:125)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:19)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:125)
 (C 1 2 P 21/02
 C 1 2 R 1:08)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☒ FADED TEXT OR DRAWING

☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.